
Année 1961

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA THIAMINE CHEZ LES BACTERIES

THESE

présentée et soutenue publiquement le 18/3/61 ¹⁹⁶¹
devant la Faculté de PHARMACIE de Nancy
pour obtenir le titre de Docteur de l'Université (Mention PHARMACIE)

p a r

Françoise LOTZ

pharmacien, licenciée ès Sciences, diplômée de Microbiologie, sérologie
et optique de la Faculté de Pharmacie.

Examineurs de la thèse :

MM. J.G. MARCHAL Professeur	Président	
E. STEIMETZ Professeur		} Juges
Mademoiselle S.BESSON Professeur		



A mes Parents, mes frères,

Monsieur le Professeur TARDY

A mes parents,

Qu'il soit le plus grand témoignage
de mon affection et de mon respect
pour vous.

avec ma profonde affection

Qu'il trouve ici l'assurance de mon
respectueux et dévoué
salut.





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547403_0026

A mon Président de thèse,

Monsieur le Professeur MARCHAL

C'est avec la plus grande bienveillance
qu'Il nous a accueillie au Laboratoire
de Microbiologie

Qu'il trouve ici l'expression de notre
reconnaissance et de toute notre
considération.

A mes Juges,

Monsieur le Professeur STEINETZ

pour l'honneur qu'Il nous fait
en acceptant de juger ce modeste travail en
siégeant dans notre Jury de thèse.

Mademoiselle BESSON, Professeur

en témoignage de notre respectueuse
reconnaissance pour les conseils éclairés
et les encouragements qu'Il nous a prodigués.

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA THIAMINE CHEZ LES BACTERIES

INTRODUCTION

Biosynthèse de la thiamine chez les Bactéries	p.2
Métabolisme de la thiamine chez les Bactéries	p.7
Dosages de la thiamine	p.13

EXPERIMENTATION PERSONNELLE

Matériel d'étude - Méthode utilisée	p.20
-------------------------------------	------

Chapitre I

Action de certaines substances sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence ou en l'absence de thiamine.

1) Action du fer	p.21
2) Action des acides aminés	p.23
3) Action d'un antibiotique	p.29
4) Action de colorants organiques:	
a) ayant une formule voisine de celle de la thiamine	p.30
b) autres colorants	p.35

Chapitre II

Effets vitaminiques d'éléments bactériens d'espèces chromogènes non sporulées à Gram négatif.

1) Essais effectués avec <i>Serratia marcescens</i>	
a) action des radiations ultra-violettes	p.40
b) action du carbonate de soude	p.41
c) action successive du carbonate de soude et des radiations ultra-violettes	p.42
d) recherche d'un principe diffusant des corps bactériens	p.45
e) extraction et essai de la prodigiosine	p.46
2) Essais effectués avec <i>Chromobacterium violaceum</i>	p.50
3) Essais effectués avec le pigment de <i>Pseudomonas cattleyae</i>	p.53

Chapitre III

Effets vitaminiques d'éléments bactériens d'espèces chromogènes sporulées à Gram positif

I) Bactéries cultivées en eau peptonée gélosée	p.63
II) Bactéries cultivées en milieu synthétique liquide	p.66
III) Action du carbonate de soude sur l'activité vitaminique de ces Bactéries	p.68
IV) Autolyse bactérienne et activité vitaminique	p.70
V) Influence de la composition des milieux de culture synthétiques sur l'activité vitaminique	
a) action du fer	p.72
b) Variation de la source d'azote	p.74
c) variation de la source de carbone	p.78
d) emploi du pyruvate de sodium comme seule source d'azote et de carbone	p.79

RESUME ET CONCLUSIONS

p.82

Index bibliographique

INTRODUCTION

La vie d'un être organisé est caractérisée par une suite ininterrompue de réactions complexes anaboliques et cataboliques qui sont favorisées par certains facteurs et inhibées par d'autres. La résultante de ces réactions assure l'équilibre de l'organisme sain. Chez les êtres multicellulaires, les hormones et les vitamines sont de puissants régulateurs du métabolisme.

D'une manière générale, la vitamine, dont la valeur énergétique est faible, contrôle la distribution des éléments nutritifs, intervient dans toutes les réactions protoplasmiques et nucléaires, et maintient l'équilibre au niveau de la cellule.

sommées

Dans le présent mémoire, nous nous intéressons plus particulièrement à un élément constituant le groupe hydrosoluble appelé "complexe vitaminique B" en envisageant la vitamine B1 ou thiamine.

Cette vitamine est représentée par la formule suivante:



Elle est constituée de deux cycles, l'un hexagonal et doublement azoté: le cycle pyrimidique, et l'autre pentagonal, azoté et soufré: le cycle thiazolique. Leur mode de liaison par l'azote thiazolique réalise un sel d'ammonium quaternaire possédant des propriétés particulières.

Les groupes CH_3 et NH_2 dans le noyau pyrimidique, CH_3 et $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$ dans le noyau thiazolique, ont une nature et une position d'une grande importance en ce qui concerne l'activité vitaminique car les composés substitués sont inactifs.

La thiamine est une substance blanche, à odeur de levure; trois for-

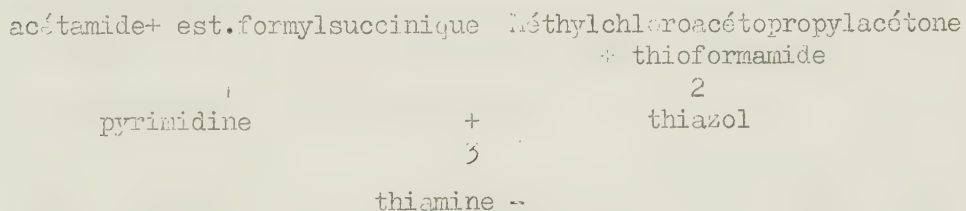
mes ont été décrites (1) (Armour Res.F) : orthorhombique, monoclinique et une forme instable présentant l'un ou l'autre aspect. Elle est hydrosoluble. Elle se dissout également dans l'alcool dans la proportion de 1,5. Par contre, elle n'est pas soluble dans l'éther, le benzène ou les huiles grasses. Son point de fusion est de 250° C. Elle a un spectre d'absorption caractéristique: il présente un maximum entre 2680 et 2350 en solution aqueuse à pH 7. Elle est optiquement inactive.

La thiamine se détruit assez rapidement par oxydation, surtout à chaud et en milieu alcalin (2 Farver).

1 BIOSYNTHESE DE LA THIAMINE CHEZ LES MICROORGANISMES -

La présence de thiamine a pu être mise en évidence dans tous les tissus vivants, cependant, seuls, certains organismes sont capables d'en faire la synthèse. Les autres doivent la trouver, en nature, dans le milieu extérieur; cette vitamine est alors un facteur de croissance pour ces organismes.

Williams et Cline (3), Todd et Bergel (4) ont montré que les différentes étapes de la biosynthèse de la thiamine correspondaient à celle que l'on réalise in vitro et peuvent se schématiser ainsi.



Lwoff (5), à la suite de ses travaux, a été conduit à représenter comme suit les différentes étapes de la synthèse biologique de la thiamine qui se fait sous l'action de plusieurs enzymes agissant successivement:

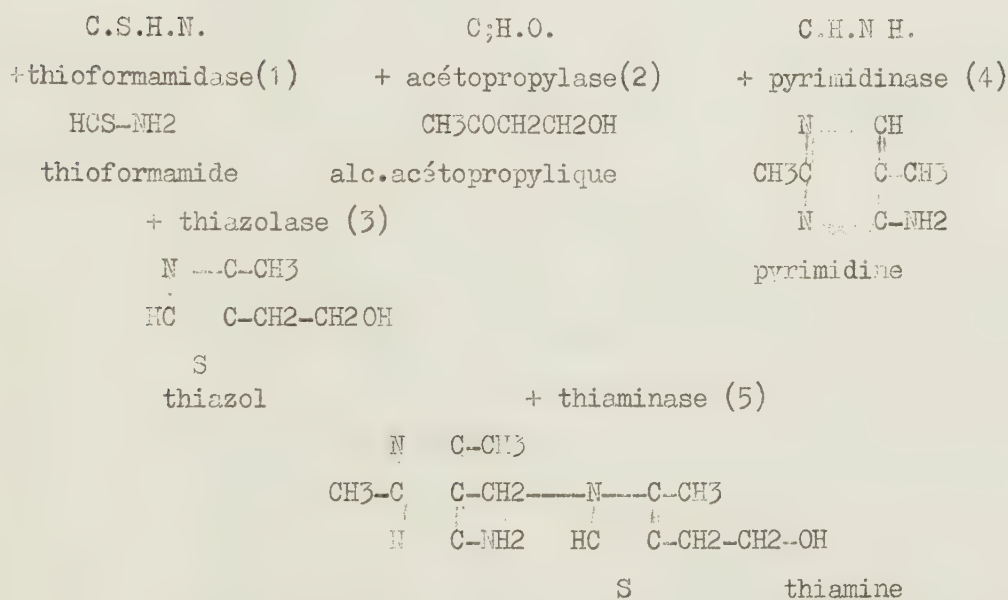
1- la thioformamide serait tout d'abord synthétisée à partir du carbone, de l'hydrogène, et de l'azote et du soufre des aliments sous l'action de la thioformamidase;

2- la synthèse de l'alcool acétopropylique serait catalysée par l'acétopropylase;

3- La combinaison de la thioformamide avec l'alcool acétopropylique en présence de thiazolase conduirait à la formation de thiazol (Buchman 6) .

4- la pyrimidine se formerait grâce à l'intervention de la pyrimidinase ou de plusieurs enzymes.

5- enfin, la synthèse de la thiamine serait finalement réalisée par la combinaison du thiazol et de la pyrimidine sous l'effet de la thiaminase, comme on peut le représenter dans le schéma suivant:



Les conditions de la formation de la pyrimidine in vitro restent encore mal définies mais on sait que l'intervention d'un certain nombre d'enzymes est indispensable.

Lwoff (1937) (5) a classé les organismes en trois catégories suivant leur aptitude à synthétiser la thiamine:

- 1 - les organismes qui font la synthèse complète de la thiamine sont placés dans la catégorie A;
- 2 - les organismes qui ont besoin d'un apport exogène de pyrimidine ou de thiazol , ou des deux substances à la fois pour se développer, appartiennent à la catégorie B;
- 3 - la catégorie C renfermerait les organismes qui ne peuvent pas vivre sans un apport exogène de thiamine.

La catégorie A est représentée par des Moisissures, tels *Aspergillus niger*, des Bactéries comme *Proteus vulgaris* et *Escherichia Coli* et des Flagellés (*Polytonia obtusum*) qui se développent dans des milieux synthétiques totalement dépourvus de thiamine, de pyrimidine et de thiazol. Or, ces organismes contiennent de la vitamine B, ils en ont donc fait la synthèse.

Dans la catégorie B nous trouvons

a) - *Phycomyces blakesleeanus*: ce champignon ne peut pas se développer sans un apport exogène de thiazol: il ne peut pas réaliser la synthèse de cette substance, même à partir de la thioformamide et de l'alcool acétopropylique ajoutés au milieu (Buchman 6). Cette synthèse résulte de l'action de la thiazolase, système enzymatique que *Phycomyces* ne contient pas.

Il en est de même pour la pyrimidine: ce champignon ne peut pas produire de pyrimidinase, et, pour se développer, il a besoin d'un apport externe de la molécule entière de pyrimidine.

b) - Le Staphylocoque est capable d'utiliser la pyrimidine et le thiazol qu'il unit pour synthétiser la thiamine.

c) - les Flagellés ont besoin d'un apport exogène de thiazol; on ne sait pas s'ils sont capables ou non d'utiliser la thioformamide et l'alcool acétopropylique. Il en est de même pour certains microorganismes qui réalisent la synthèse de la pyrimidine et non celle du thiazol: tels sont par exemple *Polytonia ocellatum*- Flagellé- et certains champignons. D'autres font la synthèse du thiazol mais non celle de la pyrimidine, tels *Parasitella simplex* (A et M Lwoff 7 et 8).

De nombreux organismes ne peuvent être classés dans aucun de ces deux groupes ce qui conduit à distinguer une troisième catégorie:

la catégorie C: celle-ci renferme des espèces incapables de combiner la molécule de pyrimidine avec la molécule de thiazol qui leur sont fournies. Un apport externe de thiamine est donc nécessaire à leur développement. Parmi ceux-ci, il faut mentionner des Bactéries (*Streptococcus salivarius*), des Moisissures (*Phytophthora cinnamomi*) et des Trypanosomidés (Lwoff 7 et 8).

Dans ses remarquables travaux, Schopfer (9) a étudié spécialement les microorganismes capables de faire la synthèse de la thiamine à partir de ses deux constituants: pyrimidine et thiazol. Il a montré que *Phycomyces blakesleeanus* peut réaliser l'union de ces deux

substances, si on les lui fournit séparément. Mais ce champignon ne se développe pas sur un milieu exempt de vitamine B₁ ou de ses constituants

Cet auteur avait observé que la présence d'un maltoseimpur dans le milieu synthétique destiné à la culture de ce champignon favorisait son développement. Il a ensuite démontré que ce maltose contenait de la thiamine.

Robbins (10) a obtenu le même développement mycélien en ajoutant au milieu de culture de *Phycomyces blakesleei* 1 ug de thiamine ou 0,5 ug de pyrimidine et 0,5 ug de thiazol.

D'autre part, 10 ug de pyrimidine et 1 000 ug de bêta-alanine se sont révélés donner un développement de *Phycomyces* équivalent

Ustilago violaceum (11) ne se développe qu'en présence de pyrimidine et de thiazol, ou lorsque l'on remplace la pyrimidine par un dérivé de la pyridine, le bromure de 2-méthyl-4-amino-6-pyrimidyl-5-méthylpyridine (Schopfer).

Schopfer a étudié avec Blumer (12) d'autres microorganismes sensibles à la thiamine.

Wood, Tatum et Peterson (13), en 1939, cultivent *Pythium butleri*, champignon qui, comme *Phytophthora cinnamomi* et *Phytophthora parentica*, ne peut pas se développer dans un milieu exempt de thiamine.

On peut encore citer les études de Mögl et Fries (14) sur *Nematospora gossypii*, celles de Fries (15) sur *Natria coccinea*, celles de Robbins et Kavanagh (16) sur *Spherulina trifolii*. Fries a également constaté l'activité de la thiamine sur certaines Basidiomycètes et sur les Algues.

Depuis, d'autres travaux ont également été publiés sur les besoins alimentaires des Levures. De toutes les sortes de levures cultivées par Burkholder (17) et Burkholder et Moyer (18), la plupart ne pouvaient croître qu'en présence de thiamine.

Emery et ses collaborateurs (19) confirment ces observations, de

même Schultz et Atkin (20) en 1947. Haag et Dalphin (21) mettaient de l'acide pyruvique en présence de levure dans un milieu sans thiamine. Après 24 heures d'incubation l'acide pyruvique était intact. Dès qu'on ajoutait de la thiamine, cet acide disparaissait.

Certaines levures peuvent faire la synthèse d'un des composants de la thiamine, pyrimidine ou thiazol et, en l'unissant à l'autre fourni par une source exogène, produit de la thiamine, c'est le cas de *Rhodotorula rubra* étudiée par Schopfer (9). La plupart des organismes examinés sont capables d'effectuer les dernières réactions de la synthèse de la thiamine, surtout si on ajoute du thiazol au milieu de culture (Funk 22)

Phycomyces blakesleeanus est capable de se développer sur des milieux sans thiamine en présence de certains organismes qui peuvent faire la synthèse de la vitamine B1. Ainsi, *Penicillium* fournit à *Phycomyces* de la thiamine et lui permet de se développer sur n'importe quel milieu synthétique.

Mucor ramanius fait la synthèse de la pyrimidine, et *Rhodotorula rubra*, celle du thiazol. Ce qui permet à ces deux organismes de réaliser la synthèse de la thiamine.

II - Métabolisme de la thiamine chez ces êtres organisés-

Schopfer a résumé ainsi (9) le métabolisme de la thiamine chez *Phycomyces blakesleeanus*; il y aurait absorption de pyrimidine et de thiazol, condensation de ces deux corps en une molécule de thiamine, enfin, estérification de la thiamine par l'acide phosphorique et formation de co-carboxylase. Cet auteur a recherché la thiamine dans les milieux où s'est développé le champignon et dans le mycélium; il y a constaté qu'elle ne s'y trouve plus; et que, par conséquent elle a été détruite.

La décomposition de la thiamine se fait dans des conditions comparables à celles qui président à la synthèse de cette vitamine. En 1937, Buchanan (5) a étudié l'action de la thiaminase qui serait réversible. L'existence de cet enzyme n'a pas encore été prouvée expérimentalement.

Mise en évidence-

a) Symptôme de carence en thiamine.

Funk (23) avait établi que la thiamine agissait sur le métabolisme des glucides; mais ce n'est que 11 ans plus tard que Kimmersley et Peters

(24) ont observé que le cerveau de pigeon carencé en vitamine B₁ contenait plus d'acide lactique que le cerveau normal. Birch et Harris (25) relient l'accumulation d'acide lactique à la bradycardie présentée par ces mêmes animaux. Ensuite Witkescu (26) a obtenu, par injections de solution de lactate ou de pyruvate à des pigeons, les manifestations caractéristiques de la carence en thiamine: l'injection de doses de 3 mg de ces produits provoquait l'apparition de symptômes de carence qui disparaissaient après l'administration de 2.000 à 5.000 μ l. de thiamine. La présence de la thiamine est donc indispensable au métabolisme de l'acide pyruvique et de l'acide lactique dans l'organisme.

b - Etudes de la carence en thiamine.

L'augmentation du taux de substances cétoniques dans le sang a été attribuée à la carence en vitamine B₁ (27 Shills). Dans le sang de rats soumis à un régime carencé en thiamine, Goth (27 bis) observe une augmentation des substances sulfo-conjuguées; celle-ci semblait due principalement à l'accumulation d'acide pyruvique.

Robinson (28) et ses collaborateurs pensaient que la mise en évidence de l'acide pyruvique suffisait à indiquer la carence en thiamine. Ils ont donc dosé cet acide dans le sang des animaux-tests. Il fallait alors tenir compte des éléments autres que la thiamine qui ont une influence sur le taux en acide pyruvique du sang.

Geiger et Rosenberg ont dosé le méthylglyoxal, produit toxique, dans l'urine des enfants carencés en thiamine (29), tandis que Chiba et ses collaborateurs (30) dosaient cette même substance dans le lait des femmes atteintes de béri-béri.

Pour Vogt-Müller (31) le méthylglyoxal aurait pu être également responsable des symptômes morbides observés chez les enfants nourris au lait de femmes atteintes de béri-béri. Pourtant le glutathion guérissait ces troubles aussi bien que la thiamine.

Peters (32) a mis en lumière les relations entre la carence en vitamine B₁ et l'accumulation d'acide pyruvique et d'acide lactique au cours d'expériences réalisées sur le pigeon normal et sur le pigeon carencé. De leur côté, Sherman et Elvehjem (33) montrèrent que l'acide pyruvique inhibait complètement l'activité de la déshydrogénase

lactique et provoquait une accumulation d'acide lactique dans les tissus. La thiamine agirait donc indirectement sur le métabolisme normal de l'acide lactique en accumulant l'acide pyruvique.

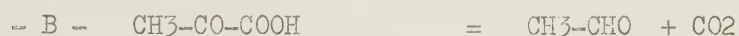
On a donc pensé que l'accumulation de méthylglyoxal pouvait, de même, être due à l'inhibition de la méthylglyoxalase par le pyruvate.

c) - Rôle de la thiamine dans le métabolisme de l'acide pyruvique-

Le métabolisme de l'acide pyruvique se résume comme suit:



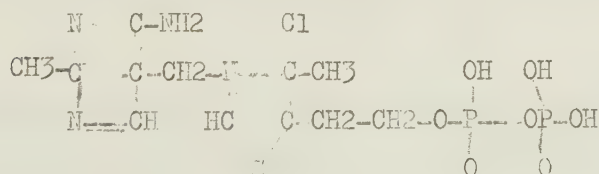
Une molécule d'acide pyruvique s'oxyde pour donner une molécule d'acide acétique et une molécule de gaz carbonique. La plupart des auteurs pensent que la thiamine est indispensable à cette réaction d'oxydation. Pour Lohman et Schuster (34) la thiamine présente dans la levure catalyse la décarboxylation anaérobie de l'acide pyruvique en acétaldéhyde et gaz carbonique suivant la réaction:



De leur côté, Krebs (35) et Hills (36) pensent que la thiamine catalyse en réalité une réaction de dismutation de deux molécules d'acide pyruvique en donnant de l'acide lactique de l'acide acétique et du gaz carbonique:



Le mode d'action de la thiamine dans ces réactions a été mis en lumière par Westenbrink et Pollak (37) qui ont observé que la réaction de décarboxylation n'avait pas lieu immédiatement après l'addition de thiamine et par Lohman et Schuster (34) qui ont isolé de levure la cocarboxylase ou pyrophosphate de thiamine dont la formule est :



pyrophosphate de thiamine

Cette structure a été confirmée par les travaux de Tauber (38), von Euler, Westen (39) et aussi par Silverman et Werkman (40) et Weil-Malherbe (41) qui réalisèrent la synthèse de cet enzyme.

d) - La cocarboxylase-

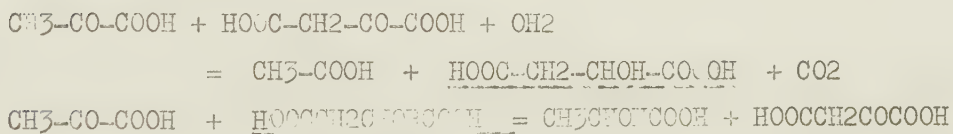
Ce coenzyme est formé dans les tissus vivants par l'action sur la thiamine libre de l'acide adénosine triphosphorique et non du mono-

phosphate de thiamine (Wiel-Malherbe (42), Lipton et Elvehjem (43)). L'activité des différents composés phosphatés de la thiamine a été comparée à celle de la cocarboxylase ; ainsi, sur le rythme cardiaque, le triphosphate de thiamine à une activité à peu près égale à celle de la cocarboxylase (44) (Velluz et ses collaborateurs).

Lipman (45) établit donc que la cocarboxylase pure de Lohman agit comme coenzyme d'un système capable de catalyser la décarboxylation de l'acide pyruvique en formant de l'acide acétique ou de l'acétaldéhyde.

En réalité, cette réaction n'est pas aussi simple; qu'on l'avait pensé, puisque la présence d'acides dicarboxyliques à 4 atomes de carbone (malique, succinique, fumarique), d'adénine nucléotide, d'ions Magnésium, et aussi de coenzymes est nécessaire (46 Benga Ochoa et Peters).

En étudiant la dismutation de l'acide pyruvique, Krebs (47) pensait que cette réaction pouvait se décomposer en deux stades avant pour intermédiaire l'acide oxalacétique qui agit alors comme transporteur d'hydrogène:



L'acide oxalacétique joue le rôle de transporteur d'hydrogène et ne sert que d'intermédiaire dans la synthèse des acides alpha-cétoglutarique succinique, fumarique, malique et aussi glutamique et aspartique, et des amines correspondantes (48 Krebs et coll.).

e) - Thiamine et acide citrique - thiamine et acides aminés-

Les chercheurs ont aussi essayé d'analyser les relations qui pourraient exister entre la thiamine et l'acide citrique d'une part, et divers acides aminés d'autre part.

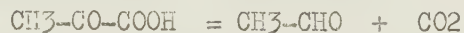
De leurs expériences, Smith et Meyer (49) ont conclu que la diminution de l'excrétion en acide citrique dans les carences en thiamine pouvait être attribuée aussi bien à un régime alimentaire qu'à l'absence de thiamine.

Les relations entre cette vitamine et les acides aminés sont en-

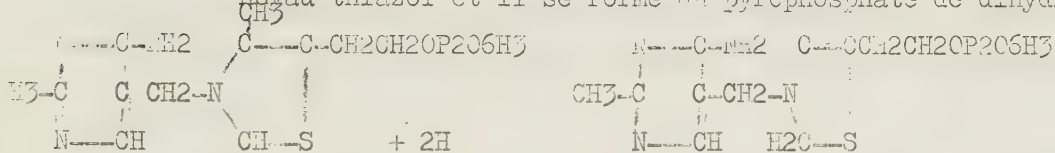
core moins précises et ces chercheurs n'ont pas pu mettre en évidence le rôle exact de la thiamine dans les réactions de transamination (50 Kritzman).

f) - La thiamine, catalyseur de déshydrogénation -

Cette vitamine se comporte comme un véritable catalyseur de déshydrogénation dans la première réaction d'oxydation de l'acide pyruvique:

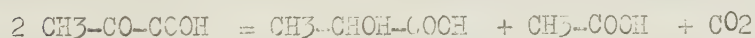


Lipman (51) l'a mis en évidence dans ses expériences sur les bactéries lactiques en particulier *B. delbrückii*. En effet, au cours de l'hydrogénation à l'aide de noir de Platine ou de la réaction par le bisulfure de sodium, un atome d'hydrogène se fixe sur le noyau thiazol et il se forme du pyrophosphate de dihydrothiamine:



L'auteur compare cette propriété à celle du ferment jaune de Warburg et suppose que cette réaction a lieu aussi bien in vivo que in vitro (52 Lipman)

Dans le tissu cérébral du pigeon, il semblerait plutôt que la thiamine ; sous la forme de cocarboxylase, catalyse une réaction de dismutation de l'acide pyruvique soit:



Stern et Melnick (53) ont confirmé les résultats de Lipman sur la réduction de la thiamine. Ces auteurs ont voulu assimiler la thiamine à un catalyseur d'oxydo-réduction mais leurs expériences ultérieures (54) leur ont montré que la cocarboxylase entièrement réduite, de même que la thiamine, était biologiquement inactive.

Barron et Lyman (55) confirment que la cocarboxylase réduite a perdu aussi bien son activité vitaminique que son activité enzymatique. La cocarboxylase est bien une partie intégrante d'une protéine activante quand elle agit comme partie d'un système enzymatique mais elle ne doit pas son activité biologique à une oxydation et une réduction réversibles.

Ces résultats sont confirmés par les expériences faites in vitro dans les tissus d'animaux carencés: une addition de thiamine accé-

lère les réactions de condensation du pyruvate aboutissant à la synthèse des glucides en passant par les sels acides alpha-cétoglutarique, citrique, acéto-acétique et succinique. Toutes ces réactions commencent comme les réactions de condensation du pyruvate et, dans chacune d'elles, il y a une étape de décarboxylation oxydative. Cependant, dans la synthèse des glucides, le pyrophosphate de thiamine peut catalyser, soit la décarboxylation du phospho-pyruvate en phospho-énol oxalacétate ou la décarboxylation de ce composé en phospho-énol-pyruvate et il est impossible de déterminer si la thiamine entre dans la composition d'un enzyme de condensation (1ère hypothèse) ou dans la composition d'un enzyme de décarboxylation oxydative (2ème hypothèse).

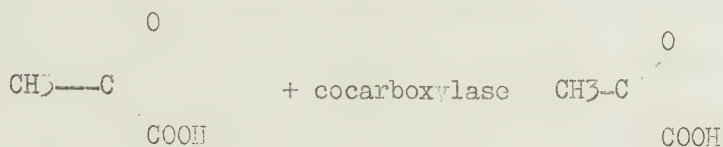
La stabilité accrue de la thiamine à la réduction et à l'oxydation sous sa forme phosphorylée semble arguer en faveur de la première hypothèse.

Les expériences de Lima et de ses collaborateurs (56) confirment que la thiamine n'entre pas dans la composition d'un système RedOx. La thiamine aurait été oxydée en un composé bisulfuré (Karrer et coll. 57) et Sebrell et coll. 58), ce composé donnant à nouveau naissance à la thiamine par réduction. Mais ce composé n'a jamais pu être mis en évidence in vivo. Au contraire, on a démontré que la cocarboxylase et sa forme thiol libéraient du gaz carbonique de l'acide pyruvique, tandis que le pyrophosphate disulfuré était inactif.

Peters (59) prouvait que la thiamine bisulfurée était au moins aussi active que la thiamine elle-même dans le test de la catatoruline, et que, en présence de composé mercaptans, le pyrophosphate de thiamine bisulfuré était capable d'effectuer la décarboxylation de l'acide pyruvique des cellules de levures lavées. Il semble que le pyrophosphate de thiamine bisulfuré soit d'abord réduit en thiamine par les mercaptans avant d'être actif dans le test de la catatoruline, qui consiste à titrer la thiamine en mesurant le dégagement d'oxygène des tissus du pigeon carencé après injection de la solution de thiamine.

De toutes ces hypothèses, la plus satisfaisante actuellement sem-

ble être celle de Barron et de ses collaborateurs (60); la thiamine activerait la molécule d'acide pyruvique comme suit:



L'acide pyruvique ainsi activé peut réagir avec les catalyseurs pour être oxydé en acide acétique, réduit en acide lactique, décarboxylé en acétaldéhyde, subir une dismutation en acides lactique et acétique ou une carboxylation en acide oxalacétique. En l'absence de thiamine, l'activation de l'acide pyruvique est impossible et toutes les transformations chimiques dans lesquelles l'acide pyruvique joue un rôle ne peuvent avoir lieu.

III DOSAGE DE LA THIAMINE -

Les premières méthodes de dosage de la thiamine furent basées sur son activité biologique, puis, apparurent de nombreuses méthodes chimiques mettant à profit les différentes propriétés de cette vitamine. Enfin, l'action très particulière de ce facteur sur la croissance de certains organismes a permis la mise au point de nombreuses méthodes de dosages microbiologiques. Nous passerons successivement en revue les méthodes chimiques, les méthodes biologiques et les méthodes microbiologiques de dosage de cette vitamine.

1) - Méthodes chimiques -

C'est Kinnersley et Peters (61) qui ont proposé la première méthode de dosage chimique de la thiamine. Ces auteurs avaient observé la coloration donnée par diazotation de la thiamine avec l'acide sulfanilique en solution formolée.

Cette couleur augmentait l'intensité pendant 30 à 60 minutes puis restait stable.

Quatre années plus tard, ces auteurs, en apportant quelques modifications à cette méthode (62), réussirent à la rendre quantitative. Cependant, l'approximation obtenue ne dépassait pas 5 %.

Prebluda et Mac Collum (63), Melnick et Field (64) ont employé la para-amino-acéto-phénone (sans formol), pour ce dosage; Ils extrayèrent la substance colorée avec du xylène et obtinrent une précision de l'ordre de 2%.

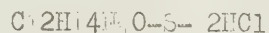
En opérant de cette manière, on dosait également le coenzyme de la carboxylase, ou cocarboxylase de la levure, constitué par du pyrophosphate de thiamine, obtenu après hydrolyse de ce coenzyme par la phosphatase.

Plus tard, Melnick et Field (65) adsorbaient ce produit coloré sur la permutite et l'éluèrent avec une solution de chlorure de potassium.

D'autres modifications, fondées sur le même principe, ont été apportées dans la suite pour rendre cette méthode plus précise.

Peters (66) avait également remarqué qu' en oxydant la thiamine avec le permanganate de potassium ou le bioxyde de manganèse à un pH inférieur à 6, on obtenait le thiochrome, substance présentant une forte fluorescence bleue, que l'on pouvait doser colorimétriquement.

Barger (67) oxydant la thiamine à l'aide d'une solution de ferricyanure de potassium, obtenait une substance jaune clair de formule:



qui, en solution neutre ou alcaline présente une fluorescence intense. Les meilleures conditions d'oxydation de la thiamine ont été précisées par Jansen (68). Cet auteur extrayait le thiochrome avec de l'isobutanol et mesurait la fluorescence de l'extrait dans un fluorimètre étalonné avec des solutions de quinine.

On peut ainsi doser la cocarboxylase ou pyrophosphate de thiamine à condition de libérer la thiamine à l'aide d'une phosphatase. Westenbrink et Jansen (69) dosent ainsi successivement la thiamine libre en solution dans l'isobutanol, et la cocarboxylase qui est soluble dans l'eau. Cette méthode n'est utilisable, cependant, que si la solution aqueuse est parfaitement limpide.

2) - Méthodes biologiques

Les premières méthodes de dosage de la thiamine furent préconisées par Jansen et Donath (70), Kinnorsley et Peters (71), qui, cherchant à isoler la thiamine, administraient les produits d'extraction de la levure et des polissures de riz à des animaux présentant des symptômes de carence.

Le principe de ces méthodes consistait dans la mesure de l'augmentation de poids observée à la suite de l'administration de quantités déterminées de thiamine à des rats carencés.

On en a proposé cependant d'autres qui sont basées sur l'étude des pulsations cardiaques (électrocardiogramme) d'animaux carencés auxquels on administre des doses données de préparations vitaminiques. Les animaux d'expériences étaient à l'origine des pigeons; actuellement on emploie les rats (72 Birch et Harris).

Le titrage de l'activité biologique de la thiamine est toujours employé et figure actuellement dans les Pharmacopées de différents pays.

3) - Méthodes microbiologiques -

Dans certaines conditions les vitamines peuvent jouer le rôle de facteurs de croissance. La découverte de cette notion a conduit à l'emploi de microorganismes pour doser certaines vitamines, et, pour mettre en évidence des traces, même infinitésimales de celles-ci; lorsque le développement bactérien est mesurable, on peut évaluer la quantité de facteur de croissance présente dans le milieu.

Dés 1919-1920, les levures étaient employées pour doser les vitamines. Williams (73) mesurait le développement de ces organismes par pesée, tandis que Bachman (74), à la même époque, enregistrait le volume de gaz carbonique dégagé par leur activité fermentaire.

Un dosage précis n'est possible que si le développement du microorganisme est proportionnel à la quantité de facteur de croissance présente dans le milieu. La plus grande précision s'obtient en opérant avec des concentrations sous-optimales de facteur de croissance.

Divers auteurs ont pu observer une proportionalité entre le développement de certains microorganismes et la teneur en thiamine du milieu de culture.

La croissance des microorganismes peut être déterminée par gravimétrie, par néphélométrie ou par dosage d'une substance qu'ils élaborent au cours de leur développement, telle que l'acide carbonique ou l'acide lactique.

Les microorganismes les plus souvent employés pour ce titrage sont les levures. Néanmoins, on peut avoir recours à des Champignons; c'est ainsi que *Phycomyces blakesleeana* a été utilisé par Schopfer (75), Meiklejohn (76), Sinclair (77) et Morell (78).

Nous allons passer successivement en revue les différentes méthodes de dosage de la thiamine à l'aide de microorganismes-tests: Champignons, Bactéries et Levures.

216
a) - Méthodes utilisant les Champignons -

- METHODE DE SCHOPFER ET JUNG -

Ces auteurs ont montré que la thiamine était indispensable au développement de *Phycomyces blakesleeanus*. Dans un milieu chimiquement défini, ils ensèment des spores de ce champignon et ajoutant des quantités déterminées de la solution de thiamine à doser. Le poids de mycélium obtenu après incubation de 7 jours à 25°C est comparé à celui qu'on observe avec des quantités connues de thiamine.

Pour que les résultats soient précis, il y a lieu d'opérer avec une dose optimale de thiamine; cette dose est d'environ 0,5 ug pour 25cm³ de milieu, soit d'environ 2 ug %. En effet, le poids de mycélium obtenu avec des doses de 0,05 0,10 jusqu'à 0,40 ug de thiamine sont proportionnels; on obtient une courbe standard, linéaire, à partir de laquelle on calcule la teneur en thiamine des solutions dosées.

Cette méthode est applicable aussi bien à la thiamine qu'à la pyrimidine et au thiazol en proportions équimoléculaires. Elle est utilisée pour mesurer la thiamine dans le sang, à condition que le pH soit maintenu entre 5,7 et 6,8, et la concentration en asparagine du milieu entre 0,2 et 0,4 %. Enfin, la quantité de thiamine ne doit pas dépasser 0,40 ug (79) (Rauch et Pecker). Cette méthode permet également de doser la thiamine dans le liquide cérébro-spinal (76 Meiklejohn).

Schopfer (75) donne des résultats pour la vitamine B₁ ou pour la pyrimidine et le thiazol seuls. La thiamine reste active sur *Phycomyces* après stérilisation par chauffage de 20 minutes à 115°C, mais, dans les mêmes conditions, elle peut devenir inactive sur les organismes animaux. De la comparaison avec les autres tests, Schopfer conclut que le test *Phycomyces* est aussi spécifique que celui au thiochrome. En effet, ce dernier peut donner des résultats erronés à la suite de la production de substances fluorescentes au cours des réactions d'oxydation (analogues à celles qui transforment la thiamine en thiochrome) sur des dérivés substitués de la thiamine (sur NH₂ en 4 et sur H en 2) .

Par contre, la cocarboxylase a le même effet sur la croissance de *Phycomyces* que la thiamine libre.

Après de fortes critiques, Thron accepte en 1941 (80), le test au *Phycomyces* de Schopfer. Il reconnaît l'importance du chlore et de la teneur en azote du milieu sur l'activité de la thiamine.

Modifications de méthode de Schopfer et Jung -

Rauch et Pecker (79) modifient le test *Phycomyces* par l'emploi de cultures submergées; ils obtiennent le maximum de croissance, donc de sensibilité au bout de 4 jours. Ils emploient comme source d'azote le sulfate d'ammonium (à la place d'asparagine).

b) - Méthodes utilisant les bactéries -

Sarett et Cheldelin (80) mesurent par turbidimétrie, la croissance de *Lactobacillus fermenti* après 16 à 18 heures d'incubation; La cocarboxylase est active sur le développement de cet organisme, qui, pour des concentrations équimoléculaires, atteint un taux environ 30, supérieur à celui de la thiamine. Après décomposition par la phosphatase, son activité redevient égale à celle de la thiamine.

West et Wilson (81) mesurent la croissance de *Staphylococcus aureus* tandis que Emerique-Blum et Lwoff (82) s'adressent à *Glaucocystis* piriforme; Niven et Smiley, à *Streptococcus salivarius* (83).

La méthode la plus employée est celle de Sarett et Cheldelin, utilisant *Lactobacillus fermenti* 36. Dans les conditions déterminées par les auteurs, le développement bactérien n'a pas lieu en présence de l'un des composants de la thiamine seul, ou des deux ensemble, ou même en présence de la molécule entière de thiamine. On peut alors doser séparément chacun de ces facteurs. Une réponse quantitative est obtenue avec 0,005 à 0,04 μ g de thiamine dans 10 cm^3 de milieu.

Le milieu de base doit contenir, en plus des éléments habituels, de la riboflavine, de l'acide para-amino-benzoïque, de l'acide

nicotinique, de la biotine, du panthoténate de calcium et de l'acide folique. La croissance des bactéries est mesurée par néphélogéométrie (Sarrett et Cheldelin 80).

Fitzgerald et Hughes (84) modifient la méthode utilisant *Lactobacillus fermenti* par l'emploi d'échantillons contenant 2 à 550 ug de thiamine comme d'une échelle de comparaison.

Pour éviter les erreurs dues à la présence de certaines substances actives sur la croissance de ces bactéries, après un premier titrage, ces auteurs détruisent la thiamine libre par du sulfate de sodium.

Un deuxième titrage donnera des résultats qui, comparés aux premiers, permettront d'évaluer la thiamine libre contenue dans le milieu étudié.

c) - Méthodes utilisant les levures -

La thiamine exerce une action stimulante remarquable sur la fermentation des glucides par *Saccharomyces cerevisiae*. On mesure alors la volume de gaz carbonique produit qui, dans des conditions déterminées, sert de mesure à la teneur du milieu en thiamine.

Cette méthode peut être directe ou indirecte; dans le premier cas le volume de gaz carbonique CO₂ détermine exactement la quantité de thiamine. Dans le deuxième cas, on effectue une première mesure, puis on détruit la thiamine par le sulfite de sodium (par clivage) ou par oxydation et on effectue une deuxième mesure. La différence entre les deux résultats permet de calculer la teneur en thiamine du milieu étudié.

Schultz (85), Haynes (86) et Benzell (87) mesurent le gaz carbonique produit par la fermentation d'une solution de sucre par *Saccharomyces cerevisiae*.

Diverses modifications ont permis d'utiliser cette méthode pour doser la thiamine dans les liquides biologiques et dans les aliments.

Williams (88) enrichit le milieu de culture de *Saccharomyces cerevisiae* avec des extraits de levure et de foie ne contenant pas de thiamine. Sa méthode détermine 0,00005 ug de thiamine dans 2,5 cm³ de milieu, 0,0020 ug ; mais les composants pyrimidique et thiazolique de la thiamine ont une activité respectivement égale à 60% et à 30% de celle de la molécule entière de vitamine. On peut également titrer la pyrimidine et le thiazol à l'aide de cette méthode; la cocarboxylase n'est pas active sur cette levure, et, pour pouvoir doser cet enzyme dans le sang, Westenbrink le fait réagir sur du pyruvate de sodium. Son activité se traduit par une fermentation et un dégagement de CO₂ dont la mesure permet de connaître la teneur du sang en cocarboxylase (89) (Westenbrink et coll.).

Atkin (90) réalise une fermentation anaérobie à l'aide de *Saccharomyces cerevisiae*.

Les trois catégories de méthodes de dosage de la thiamine :
- chimique - biologique - et - microbiologique - sont toujours utilisées actuellement.

Les méthodes chimiques conviennent particulièrement lorsque la thiamine se trouve libre dans un liquide clair, puisque la mesure finale est colorimétrique; il est toutefois possible d'extraire le produit coloré.

Les titrages biologiques ne nécessitent pas d'extraction, mais, l'administration de thiamine à des animaux nécessite des installations et des élevages coûteux.

Les titrages microbiologiques sont d'un emploi plus facile et leur précision rigoureuse en a permis des applications très étendues.

EXPERIMENTATION PLASME ALL.Méthode utilisée et plan de travail

Nous avons utilisé dans nos expériences la méthode de dosage de l'activité de l'isothiamine à l'aide de *Phycomyces blakesleeanus* préconisée par Schopfer et Jung (75).

Mode opératoire -

La composition du milieu est la suivante:

PC4H2N	0,50 g
SO4Mg.7 OH2	1,50 g
glucose	100,00 g
asparagine	4,00 g
eau distillée q.s.	pour 1000 cm ³

Le pH doit être compris entre 3 et 7, car, en dehors de ces limites, il n'y a pas de développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Ce milieu est réparti en fioles d'Erlenmeyer à raison de 20 cm³ par flacon.

La source de thiamine servant de témoin est constituée par une solution de Sévitine.

Une série de systèmes est réalisée, dans lesquels la substance à essayer est ensuite apportée.

On procède alors à l'ensemencement avec une suspension de spores de *Phycomyces blakesleeanus* (0,1 cm³). Cette suspension est obtenue en prélevant quelques sporangiophores de *Phycomyces blakesleeanus* sur des cultures en eau peptonée gélosée. Pour obtenir des concentrations en spores constantes, on compte les spores en suspension dans l'eau distillée et on ramène la concentration de la suspension à 100 spores/1,25 mm³ (cellule compte-microbes de Nageotte).

Les Erlenmeyer sont alors placés à l'étuve à 25°C. Après 14 jours d'incubation, on récolte les filaments mycéliens sur des filtres tarés qui sont desséchés à 100°C. jusqu'à poids constant.

Les poids obtenus indiquent l'activité vitaminique des suspensions utilisées comme source de thiamine.

Dans un premier chapitre, nous avons étudié l'influence sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* de l'addition au milieu de Schopfer et Jung de substances entrant dans la composition habituelle des milieux de culture tels le fer et certains acides aminés.

D'autre part, nous avons ajouté de la streptomycine au milieu afin de déterminer si cet antibiotique avait une influence sur le développement mycélien.

Faisant suite aux expériences énoncées ci-dessus, nous avons étudié, dans un deuxième chapitre, l'action de l'addition au milieu de Schopfer et Jung de corps bactériens d'espèces chromogènes sur le développement mycélien; les corps bactériens étaient alors utilisés comme source de thiamine.

Nous avons successivement fait agir les radiations ultra-violettes et le carbonate de soude sur les corps bactériens étudiés afin de déterminer le comportement du facteur à activité vitaminique contenu dans ces corps bactériens, ces expériences étant réalisées simultanément sur les mêmes espèces bactériennes de variété achromogène.

Nous avons également fait l'analyse chromatographique du pigment bactérien.

Dans un troisième chapitre, nous avons utilisé comme source de thiamine des corps bactériens d'espèces sporulées et Gram + . Ces bactéries ont été cultivées dans des conditions variables, milieux solides, liquides et diverses modifications ont été opérées dans ces dernières: variations de la source de carbone et d'azote.

CHAPITRE I

ACTION DE CERTAINES SUBSTANCES SUR LE DEVELOPPEMENT DE PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS EN PRESENCE OU EN L'ABSENCE DE THIAMINE --

D'abord, nous avons étudié l'action de substances entrant dans la composition habituelle des milieux de culture à cause de leur haute activité biologique, tels le fer et certains acides aminés.

D'autre part, nous avons étudié l'action d'un antibiotique, la streptomycine C.

Enfin, nous avons introduit dans le milieu des dérivés organiques ayant dans leur formule certains éléments communs avec la thiamine, tels le jaune de thiazol, le jaune de chloramine U, la prinuline, la xanthine, pour mettre en évidence l'activité biologique de ces substances sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

Nous avons également utilisé certains colorants qui ont une action antiseptique pour voir s'ils avaient une influence sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

-- Action du fer --

Le fer entre toujours dans la composition des milieux de culture des Bactéries et des Champignons. Nous avons voulu déterminer son action, dans les conditions de nos expériences, sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

A cet effet, on ajoute 5 mg de SO_4Fe , en solution aqueuse, à des flacons d'Erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung, à 10 µg de thiamine

Une partie des flacons est alors soumise à l'action des radiations ultra-violettes pendant deux heures. (Les radiations utilisées sont produites par une lampe du type Hanau privée de son écran de Wood).

Ces radiations ont une action oxydante sur le sulfate ferreux qui se

transforme rapidement en composé ferrique de coloration rouge.

Ces flacons étaient alors ensemencés avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus* et placés à l'étuve à 25°C pendant 14 jours. Les poids de mycélium sec récoltés étaient les suivants:

Tableau I - Action du sulfate ferreux sur la croissance de *phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine avec et sans traitement par les radiations ultra-violettes

Poids de mycélium sec récolté en ajoutant au milieu (20 cm³) de Schopfer et Jung les quantités indiquées de SO₄Fe et de thiamine irradiée ou non irradiés.

	Thiamine en ug		SO ₄ Fe en mg		Poids de mycélium sec récolté en mg
	irradiée	non irradiée	irradiée	non irradiée	
1	-	10	-	5	88
2	-	10	-	-	83
3	-	-	-	5	0
4	-	10	5	-	25
5	10	-	-	-	8
6	10	-	-	5	16
7	10	-	5	-	4
8	10	-	5	-	12

Dans l'expérience, la thiamine et le sulfate ferreux ont été soumis ensemble aux radiations ultra-violettes dans les flacons (8) L'examen de ce tableau indique:

- que la présence du fer dans le milieu ne favorise pas de façon notable le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.
- que, par irradiation le Fer ferreux Fe⁺⁺ s'oxyde en Fer ferrique Fe⁺⁺⁺ qui se manifeste par un précipité rouille d'hydroxyde ferrique Fe(OH)₃. Ce composé semble avoir une action inhibitrice sur la croissance du champignon.
- que le fer présent pendant l'irradiation de la thiamine semble protéger celle-ci partiellement du moins, de l'action inhibitrice des radiations ultra-violettes.
- la présence de fer non irradié favorise de façon notable le développement du champignon en présence de thiamine irradiée.

2 - ACTION DES ACIDES AMINÉS -

La composition des milieux de culture habituels des bactéries et des Champignons comporte toujours un certain nombre d'acides aminés et nous avons voulu essayer l'action de certains d'entre eux sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

a) - le glycocolle -

Parmi les acides aminés facilement assimilables, nous avons choisi le glycocolle et la dl alanine.

A cet effet, 0,1 0,2 0,5 et 1,00 mg de cet acide aminé sont ajoutés à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. La solution d'acide aminé était rendue stérile par filtration sur bougie L3.

Les systèmes obtenus étaient ensemencés avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus* et placés à l'étuve à 25°C pendant 14 jours.

Les poids de mycélium secs obtenus ont été les suivants:

TABEAU II -

Action du glycocolle sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

Poids de mycélium sec obtenus après 14 jours de croissance dans 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung contenant les quantités indiquées de glycocolle et de thiamine.

thiamine en ug	glycocolle en mg	Poids de mycélium en mg
5	..	105
-	1	0
5	0,1	82,5
5	0,2	85
5	0,5	110
5	1,0	102,5

L'examen de ce tableau nous permet de constater que:

cet acide aminé ne permet pas la croissance du champignon-test en l'absence de thiamine.

En présence de thiamine, il ne modifie pas de façon importante la récolte de mycélium aux concentrations étudiées.

b) - dl alanine -

0,01 et 0,1 mg de dl alanine étaient ajoutés à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. Les solutions d'acide aminé et de thiamine étaient traitées ou non par les radiations ultra-violettes pendant une durée de deux heures.

Les poids de mycélium sec de *Phycomyces blakesleeanus* obtenus ont été les suivants :

TABLEAU III -

Action de la dl alanine sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* avec ou sans thiamine et après ou avant traitement par les radiations ultra-violettes.

Poids de mycélium sec de *Phycomyces blakesleeanus* récolté après 14 jours de croissance dans 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung contenant les quantités indiquées de thiamine et de dl-alanine irradiées ou non.

thiamine en ug		dl alanine (mg)		Poids de mycélium sec en mg
irradiée	non irradiée	irradiée	non irradiée	
-	5	-	-	60
-	10	-	-	72
5	-	-	-	10
10	-	-	-	15
-	-	-	0,01	5
-	-	-	0,1	0
-	-	0,01	-	5
-	-	0,1	-	10
-	5	-	0,01	65
5	-	0,01	-	5
-	10	-	0,1	4
10	-	0,1	-	15

L'examen de ce tableau nous permet de constater que:

- la dl alanine n'augmente pas le développement du champignon-test en présence de thiamine.

cet acide aminé présent pendant l'irradiation de la thiamine, ne protège pas cette vitamine de l'action inhibitrice des radiations ultra-violettes.

c) - L'uracile -

Nous avons ensuite étudié l'action de cet acide aminé sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* dans les conditions décrites plus haut.

Les doses d'uracile ajoutées à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung étaient de 5, 10 et 20 ug. Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau ci-dessous

TABEAU IV

Action de l'uracile sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine

Poids de mycélium récolté en ajoutant à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de thiamine et d'uracile

thiamine en ug	uracile en ug	poids de mycélium en mg
-	25	0
-	50	0
-	100	0
12,5	-	50
12,5	25	35
12,5	50	65
12,5	100	50
25	-	65
25	25	60
25	50	65
25	100	55
50	-	70
50	25	65
50	50	61
50	100	62

L'examen de ce tableau nous permet de conclure que

-- l'addition d'uracile au milieu de Schopfer et Jung n'a pas une action notable sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

d) - La tyrosine et l'alanine -

Ces deux acides aminés étant fréquemment associés dans les milieux de culture, nous les avons ajoutés simultanément et séparément au milieu de Schopfer et Jung contenant de la thiamine.

A cet effet, des doses de 10 et 20 ug de chacun de ces acides aminés étaient réparties dans des flacons contenant 20 cm³ de

milieu synthétique de Schopfer et Jung en même temps que 5 ug de thiamine.

Nous avons observé les résultats indiqués dans le tableau suivant:

TABLEAU V --

Action de la tyrosine et de la dl alanine sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

Poids de mycélium sec récolté en ajoutant à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de thiamine, de tyrosine et de dl alanine:

thiamine ug	tyrosine ug	dl alanine ug	Poids de mycélium sec mg
5	10	-	80
5	20	-	78
5	-	10	65
5	-	20	65
5	-	-	65
-	10	-	0
-	-	10	0
5	10	10	76
5	20	20	91

L'examen de ce tableau nous permet de constater que:

- la tyrosine favorise la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine;
- l'action de la dl alanine seule n'a aucune action notable sur le développement de ce champignon en présence de thiamine, comme nous l'avons remarqué dans les expériences décrites plus haut;
- la présence simultanée de la tyrosine et de la dl alanine dans le milieu de culture augmente l'utilisation de cette vitamine par *Phycomyces blakesleeanus*.

e) - L'acide folique --

Cet acide aminé est indispensable au développement de certains microorganismes (*Lactobacillus casei* et *Plectridium tetani*). Nous

avons voulu voir si la présence dans le milieu de culture synthétique influençait la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

Nous avons ajouté des quantités de 10 et 100 ug d'acide folique (solution stérilisée par filtration sur bougie L3), à des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung additionnés ou non de 5 ug de thiamine, de pyrimidine ou de thiazol.

Les résultats obtenus ont été les suivants:

TABIEAU VI -

Action de l'acide folique sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine, de pyrimidine ou de thiazol. Poids de mycélium récolté en ajoutant à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de thiamine, de pyrimidine ou de thiazol.

thiamine en ug	--	--	5--	5	--	--	--	--	5
pyrimidine ug	--	--	--	--	--	--	5	5	--
thiazol ug	--	--	--	--	5	5	--	--	--
acide folique ug	10	100	10	100	10	100	10	100	--
Pds mycél. mg	10	5	75	88	10	8	8	16	55

L'examen de ce tableau nous permet de constater que l'acide folique, vitamine du groupe B, ne peut se substituer, ni à la thiamine, ni à la pyrimidine, ni au thiazol quant à leur activité sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en milieu synthétique.

Cependant, l'addition d'acide folique au milieu de Schopfer et Jung contenant de la thiamine augmente l'activité de cette vitamine sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Nous avons voulu nous rendre compte si l'irradiation des solutions d'acide folique modifiait les résultats observés. A cet effet, les solutions employées étaient soumises durant 2 heures au rayonnement émis par une lampe de Hanau privée de son écran de Wood. Les solutions étaient placées dans des boîtes de Pétri en quartz à 12 cm de la lampe émettrice.

Nous avons obtenu les résultats suivants

TABEAU VII

Action de l'acide folique irradié sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine, de pyrimidine ou de thiazol.

Poids de mycélium récolté en ajoutant au milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de thiamine, de pyrimidine ou de thiazol et d'acide folique irradiés.

	acide folique en ug /20 cm ³ de milieu			
	0		100	
	irrad.	non irradié	irrad.	non irradié
thiamine ug				
0	0	0	0	0
1 irradiée	5	0	0	25
non irr.	-	77,5	-	55
2,5 irradiée	0 25	-	30	-
non irr.	50 -	77,5	-	70
5 irradiée	10	-	35	-
non irr.	-	50	-	65
10 irradiée	0 25	-	55	-
	-	77,5	-	90

Alors que l'irradiation supprime toute action stimulante de la thiamine sur la croissance du champignon, la présence d'acide folique irradié ou non irradié permet un développement notable de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

Conclusions -

D'une manière générale, on peut conclure qu'aucuns des acides aminés étudiés ne peut remplacer la thiamine dans son action sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Cependant, l'addition au milieu de culture d'acide folique ou d'une association de tyrosine et de dl alanine augmente de façon notable l'activité biologique de la vitamine B₁ sur la croissance du champignon.

3 - ACTION DES ANTIBIOTIQUES -

Certains *Penicillium* favorisent de façon remarquable la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en milieu synthétique. Nous avons essayé d'ajouter au milieu de culture synthétique certains antibiotiques: l'essai fait avec la streptomycine ajoutée à raison de

1.000 , 5.000 et 10.000 unités pour 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung a donné les développements de *Phycomyces blakesleeanus* correspondants aux poids de mycélium indiqués dans le tableau ci-dessous :

TABLEAU VIII -

Action de la streptomycine sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

Poids de mycélium sec obtenus en ajoutant à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de thiamine et de streptomycine :

thiamine ug	5	0
streptomycine Unités/20 cm ³		
1.000	37,5	5
5.000	33,7	5
10.000	17,5	5
0	22,5	-

De l'examen de ce tableau, il ressort que :

- les concentrations les plus faibles en streptomycine semblent avoir une action favorable sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine,
- au contraire, des concentrations de 10.000 U/20 cm³ entravent le développement du champignon.

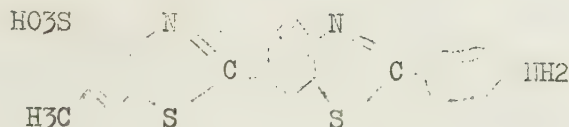
4 - ACTION DES COLORANTS ORGANIQUES -

I - Nous avons également étudié l'action de certains colorants organiques dont la formule a des éléments communs avec celle de la thiamine, pour voir si ces colorants pouvaient être utilisés par *Phycomyces blakesleeanus* pour sa croissance.

a) - la primuline -

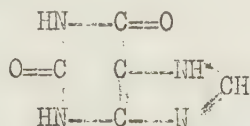
La primuline est un colorant synthétique obtenu par Green en 1887 par chauffage de la para-toluidine avec du soufre et par sulfonation du composé ainsi formé. Sa formule développée comporte deux noyaux pentagonaux contenant du soufre et de l'azote (analogie avec le thiazol).

Elle est la suivante:



b) - la xanthine -

La xanthine est la 2-6 di-oxy-purine $C_5H_4N_2O_2$.

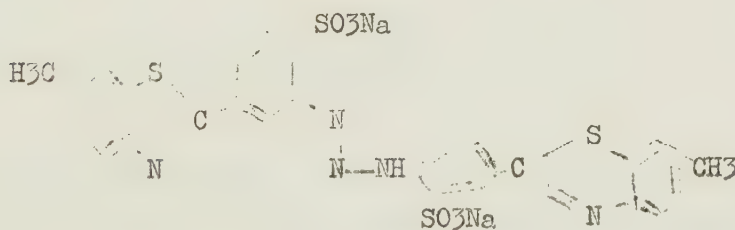


Comme la thiamine, elle comporte un noyau hexagonal et un noyau pentagonal.

c) - le jaune de thiazol -

Le jaune de thiazol est un dérivé de la diazo-amido-déhydro-thio-toluidine. Il a été obtenu par Green en 1887 par diazotation de la primuline et traitement à l'ammoniaque.

Sa formule développée est la suivante:



d) - le thiocarmin R. -

Le thiocarmin R est une di méthyl-benzyl-para-amino-benzothiazine sulfonée. Il a été obtenu par Weinbrug en 1890.

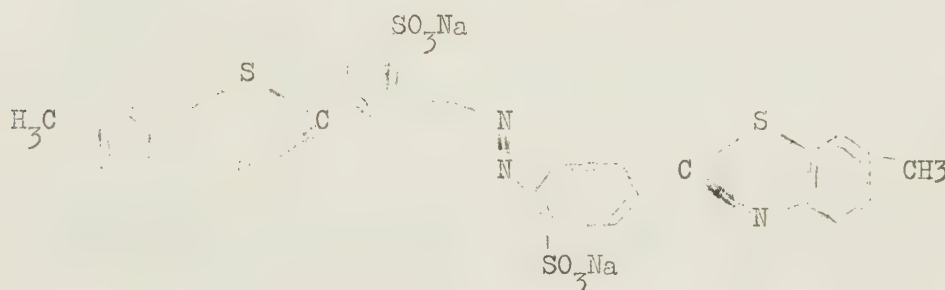
Sa formule développée est la suivante:



e) - le jaune de chloramine C.

Le jaune de chloramine C est un disulfonate de sodium. Il a été obtenu par Green en 1887 par oxydation de la primuline.

Sa formule est la suivante:



MODE OPERATOIRE -

Chacun de ces colorants est utilisé sous forme de solution aqueuse à 0,1 %, stérilisée par filtration sur bougie L3.

Des volumes de 0,5 cm³ de chacune de ces solutions étaient répartis dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. La concentration finale de colorant était donc de 250 ug %.

A certains flacons, on ajoutait 5ug de thiamine, de pyrimidine ou de thiazol.

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU IX -

Action des colorants organiques sur le développement de *Phycomyces blakesleeana* en présence de thiamine, pyrimidine ou thiazol.

Poids de mycéliums sec de *Phycomyces blakesleeana* récolté après culture dans 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung additionné ses quantités indiquées de thiamine et de colorants de pyrimidine ou de thiazol.

colorant 250 ug	primu- line	xanthine	jaune de thiazol	jaune de chlor. C	thiocar- min R
seul	5	35	25	50	75
+thiamine 25 ug	60	82,5	5	42,5	17,5
+pyrimid. 25 ug	5	52,5	12,5	15	22,5
+thiazol 25 ug	50	30	15	20	32,5

témoin sans colorant	
pyrimidine + thiazol	60
25 ug %	

De l'examen de ce tableau, on peut tirer les conclusions suivantes:

- la primuline provoque un meilleur développement mycélien en présence de thiazol qu'en présence de pyrimidine, bien que sa formule comporte déjà un noyau soufré;
est
- la xanthine active seule, sans addition de thiamine, ni d'aucun de ses composants. Robbins et Kavanagh (87 bis), d'une part, avaient déjà mis en évidence le rôle de son dérivé, l'hypoxanthine, comme facteur de croissance temporaire pour *Phycomyces blakesleeana*.
- le jaune de thiazol, ajouté au milieu, empêche la thiamine de jouer son rôle favorisant sur la croissance du champignon;
- le jaune de chloramine C, seul, a une action notable sur le développement de *Phycomyces blakesleeana*. Ajouté au milieu, ce colorant, comme le précédent, diminue l'activité de la thiamine sur le développement de *Phycomyces blakesleeana*.

- le thiocarmin R est actif seul; associé à la thiamine, il en contrarie les effets comme les deux précédents. Il en est de même lorsqu'on ajoute au milieu de la pyrimidine ou du thiazol.

Action de ces colorants soumis à l'action des radiations ultra-violettes.

Pour étudier l'action de l'irradiation ultra-violette sur l'activité de ces colorants sur le développement de *Phycomyces blakeslecanus*, nous avons procédé de la manière suivante :

2 cm³ de solution de colorant à 0,01 % étaient placés dans des boîtes de quartz et exposés au rayonnement ultra-violet. Simultanément, un même volume de solution à 0,01 % de thiamine était irradié.

Les solutions de colorant étaient alors réparties à raison de 0,5 cm³ dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung avec et sans thiamine (concentration de 5 µg pour 20 cm³).

TABEAU X -

Action de certains colorants organiques traités par les rayons ultra-violetts sur le développement de *Phycomyces blakeslecanus* en présence de thiamine soumise ou non à l'irradiation ultra-violette.

Poids de mycélium récolté en ajoutant au milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de thiamine et de colorants irradiés ou non.

thiamine 2,5 µg %	solutions non irradiées	solutions irradiées
seule	45	0
+ primuline (250 µg %)	42	40
+ xanthine (250 µg %)	67	75
+ jaune de thiazol 250 µg %	10	35
+ J. de chlor.C 250 µg %	35	30
+ thiocarmin R 250 µg %	57	35

De l'examen de ce tableau, il ressort que

- le jaune de thiazol semble plus actif sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* lorsque les 2 solutions de thiamine et de colorant sont soumises à l'irradiation par les rayons ultra-violet.
- la primuline protège la thiamine de l'action destructrice des rayons ultra-violet.
- le jaune de chloramine C, comme le thio-carmin R, semblent manifester leur activité propre après irradiation.
- la xanthine est active sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*, indépendamment de la thiamine, comme nous l'avons dit plus haut. L'irradiation par les rayons ultra-violet a peu d'influence sur cette activité.

On peut donc tirer les conclusions suivantes quant à l'activité de ces colorants sur le développement du champignon-test avec ou sans thiamine:

- le jaune de thiazol est actif seul.

Cette activité ne s'ajoute pas à celle de la thiamine, au contraire; on observe que la présence simultanée de thiamine et de jaune de thiazol dans le milieu ne permet pas un développement mycélien aussi important que la présence de l'un ou l'autre de ces deux facteurs.

L'irradiation ultra-violette détruisant la thiamine, permet au jaune de thiazol de manifester son activité.

- la primuline n'est pas active sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en l'absence de thiamine. Sa présence pendant l'irradiation protège la thiamine de l'action destructrice des radiations.
- le jaune de chloramine C, comme le thiocarmin R contra-rient l'activité de la thiamine sur la croissance du champignon. La destruction de cette vitamine par les radiations ultra-violettes leur permet de manifester leur activité propre sur le développement mycélien.
- l'activité de la xanthine s'ajoute à celle de la thiamine; elle n'est pas modifiée par l'irradiation ultra-violette contrairement à celle de cette vitamine.

II - Nous avons également étudié l'action d'autres colorants organiques de formules diverses sans rapport avec celle de la thianine, afin de voir si leur propriété de colorant avait une action quelconque sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thianine.

1) - Le vert malachite c'est un dérivé hexaméthylé dont la formule est la suivante:



2) - Le violet de gentiane est un colorant constitué par un mélange de ce dérivé avec le dérivé pentaméthylé correspondant.

3) - L'éosine est le sel de sodium de la tétra-bromo-fluorescéine dont la formule est la suivante:



4) - l'érythrosine est le sel de sodium de la tétra-iodo-fluorescéine. Sa formule est la suivante:



A) - LE VIOLET DE GENTIANE.-

On utilisait une solution de colorant à 0,01 % dans l'eau distillée qui était stérilisée par filtration sur bougie L1 et répartie dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung à raison de 0,5 cm³ par flacon.

Une partie des flacons contenait une solution soumise durant 2 heures à l'irradiation par les radiations ultra-violettes; on ajoutait alors la solution de thianine de façon à obtenir des concentrations de 2,5 5 et 10 µg pour 20 cm³ de milieu; cette

solution vitaminique était également soumise à l'irradiation.

On obtenait les résultats suivants:

TABEAU XI -

Action du violet de gentiane sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine après ou avant traitement par les radiations ultra-violettes.

Poids de mycélium récolté en ajoutant au milieu de culture les quantités indiquées de thiamine et de violet de gentiane irradiée ou non.

		solutions non irradiées	solutions irradiées
thiamine 5ug		50	10
violet de gentiane 50ug		0	0
thiamine + violet de gent.			
2,5ug	25ug	77	62,5
5	50	70	55
10	100	80	50

Nous pouvons donc conclure que:

- seul, le violet de gentiane est incapable de faire pousser *Phycomyces blakesleeanus*.
- l'addition de ce colorant au milieu contenant de la thiamine augmente l'activité de cette vitamine sur la croissance de ce champignon.
- l'action de l'irradiation ultra-violette est moins sensible sur la thiamine irradiée en présence de violet de gentiane que lorsque cette vitamine est irradiée seule.

B) - ERYTHROSINE ET EOSINE.

On réalisait des solutions de ces colorants à 0,01 %. Une partie de ces solutions filtrées sur bougie L1 était soumise à l'irradiation par les radiations ultra-violettes pendant deux heures.

On répartissait des volumes déterminés de ces solutions dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung de façon à

obtenir des concentrations de 25, 50 et 100 ug de ces colorants pour 20 cm³ de milieu. On ajoutait la solution de thiamine irradiée et non irradiée de façon à obtenir des concentrations de 2,5 , 5 et 10 ug de thiamine pour 20 cm³ de milieu. On obtenait les résultats suivants:

TABIEAU XII -

Action de l'érythrosine et de l'écotine sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

Poids de mycélium récolté en ajoutant au milieu de culture les quantités indiquées de thiamine, d'érythrosine et d'écotine soumises ou non à l'irradiation ultra-violette.

thiamine		solutions	
		non irradiées	irradiées
5ug		80	35,5
10ug		90	50
thiamine+érythrosine			
2,5ug	25ug	50	25
5 ug	50ug	60	25,5
10 ug	100ug	55	30
thiamine+ écotine			
2,5ug	25ug	55	7,5
5 ug	50ug	60	25,5
10 ug	100ug	55	30

De ces expériences ,il ressort que:

-ces colorants semblent avoir une action inhibante sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

-la présence de ces colorants pendant l'irradiation de la vitamine B1 ne protège pas cette substance de l'action inactivante exercée sur elle par les radiations ultra-violettes.

C) - VERT MALACHITE -

La même expérience a été réalisée avec des solutions à 0,01% de vert malachite. Elle a donné les résultats suivants:

TABEAU XIII -

Action du vert malachite sur le développement de *Phycomyces blakeslee* en présence de thiamine.

Poids de mycélium récolté en ajoutant au milieu de culture les quantités indiquées de vert malachite et de thiamine.

thiamine		solutions	
		non irradiées	irradiées
5 ug		50	30
10 ug		90	30
thiamine + vert malachite			
2,5ug	25 ug	40	0
5 ug	50 ug	10	0
10 ug	100 ug	5	0

De ce tableau , il ressort que:

- le vert malachite entrave le développement de *Phycomyces blakeslee* en présence de thiamine.

- la présence de vert malachite dans la solution de thiamine au cours de l'irradiation ne protège pas cette vitamine de l'action inactivante des radiations. L'irradiation entraîne la destruction de l'action vitaminique.

CHAPITRE II

EFFETS VITAMINIQUES D'ELEMENTS BACTERIENS D'ESPECES CHROMOGENES
NON SPORULEES A GRAM NEGATIF -

1 - Essais effectués avec S.marcoscens -

Au cours des recherches antérieures effectuées pour mettre en évidence la vitamine B1 dans les suspensions de corps bactériens en ayant recours à la mesure de leur activité sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*, nous avons observé que les variétés chromogènes et achromogènes de *Serratia marcescens* se comportaient de façon différente, comme il résulte des expériences suivantes: ces bactéries cultivées durant 3 jours à la température de 25°C, sur gélose peptone, étaient lavées plusieurs fois à l'eau distillé. Les culots de centrifugation étaient dispersés dans le même véhicule réalisant une concentration de 350mg de bactéries pesées humides par cm³ de liquide. Après chauffage à 115°C pendant 30 minutes, puis abandon durant 4 heures à la température ambiante, les suspensions homogénéisées par une longue agitation, étaient réparties à raison de 1cm³ par erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. Les flacons étaient ensemencés avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus*. Un témoin sans suspension microbienne était additionné de 10 ug de thiamine et ensemencé dans les mêmes conditions. Après 4 jours d'incubation à 25°C, on déterminait le poids de mycélium obtenu après dessiccation à 100°C jusqu'à poids constant.

Les résultats obtenus ont été les suivants:

TABEAU XIV.-

Action des corps bactériens de *S.marcoscens* de variété chromogène et achromogène provenant de culture en milieu solide sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

suspension bactérienne	Poids de mycélium sec mg
var.chromogène	0
var.achromogène	60
flacon témoin(10ug de thiamine) (/20 cm ³ de milieu)	70

De l'examen de ce tableau, il résulte que:

- les suspensions de *S.marcescens* de variété chromogène ne permettent pas la croissance du champignon.
- les suspensions de bactéries non chromogènes ont une activité incontestable sur la croissance du champignon;
- l'activité de ces dernières bactéries est comparable à celle de 10 ug de thiamine (pour les concentrations indiquées de suspension)

Les suspensions de *Serratia marcescens* ayant une action manifeste sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*, nous avons tenté d'en préciser la nature.

S'agirait-il d'une substance identique à la vitamine B₁ ou d'un facteur de départ pour la culture du champignon-test?

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons mis à profit tout d'abord, les propriétés que possèdent les rayons ultra-violets de détruire la vitamine B₁.

On sait, d'autre part, que le carbonate de soude exerce une action oxydante inactivante sur cette vitamine.

Nous avons opéré de la manière suivante:

a) -- Action des rayons ultra-violets sur les suspensions bactériennes

Une suspension de *Serratia marcescens* achronogène obtenue à partir d'une culture en eau peptonée gélosée effectuée durant 5 jours à la température de 37°C était lavée puis amenée à la concentration de 680 ng de corps bactériens pour 10 cm³ d'eau distillée.

Une fraction de cette suspension de bactéries vivantes était soumise à l'irradiation par les rayons ultra-violets (produits par une lampe de Hanau privée de son écran de Wood) durant deux heures alors qu'une autre fraction de la suspension non traitée, servait de témoin.

Des volumes de 0,5 et 1 cm³ de ces suspensions portées toutes deux à 100°C pendant 1/2 heure, étaient ajoutés à 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung et, 15 jours après l'ensemencement avec des spores de *Phycomyces blakesleeana*, on procédait à la détermination des poids de mycélium sec qui furent les suivants:

TABEAU XV -

Action des suspensions de corps bactériens tués de *Serratia marcescens* sur la croissance de *Phycomyces blakesleeana* avant et après irradiation:

Poids de mycélium récolté en ajoutant au milieu les quantités indiquées de suspensions bactériennes irradiées ou non:

thiamine 10 ug	non irradiée	irradiée
	50	10
suspension de <i>S. marcescens</i>	non irradiée	irradiée vivante
0,5 cm ³	37,5	26
1 cm ³	44	27,5

De l'examen de ce tableau, il ressort que: la quantité de substance active sur la croissance de *Phycomyces blakesleeana* n'est pas proportionnelle à la quantité de corps bactériens utilisés et que l'action des rayons ultra-violetts atténue sensiblement la valeur de ce facteur activant.

L'irradiation n'a pas changé le comportement des corps bactériens chauffés à 100°C durant quelques minutes.

b) - Action du carbonate de soude -

Des corps bactériens provenant d'une culture sur gélose peptone étaient recueillis et lavés plusieurs fois dans l'eau distillée. Une fraction de ceux-ci était remise en suspension dans le même liquide de dispersion alors qu'une autre était homogénéisée avec une solution de carbonate de soude à 10%. On abandonnait ces deux systèmes pendant 90 minutes et on les soumettait ensuite à la con-

trifugation; les culots étaient à nouveau dispersés dans l'eau distillée et répartis après 30 minutes de séjour à 110°C, dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. On procédait ensuite à leur ensemencement avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus*.

Les résultats obtenus ont été consignés dans le tableau suivant:

TABEAU XVI -

Action des suspensions de *S.marcescens*, de variété achronogène, traitées ou non par le carbonate de soude, sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

Poids de mycélium sec de *Phycomyces blakesleeanus* obtenu après 14 jours de culture en ajoutant au milieu synthétique les suspensions indiquées:

	Poids de mycélium en mg
flacon témoin: thiamine 10ug	90
suspension de <i>S.marcescens</i> achromogène témoin	69
suspension de <i>S.marcescens</i> achromogène traitée par CO_3Na_2 à 10%	45

Ce tableau nous montre que le contact des bactéries avec le carbonate de soude a entraîné une perte de l'activité de celles-ci vis-à-vis de *Phycomyces blakesleeanus*.

Les corps bactériens ne protègent donc pas la thiamine qu'ils contiennent de l'action destructrice du carbonate de soude.

c) - Action successive du carbonate de soude et des rayons ultra-violetts.

En opérant avec des suspensions identiques aux précédentes dont certaines avaient été irradiées alors qu'elles étaient encore vivantes, tandis que les autres avaient été préalablement tuées par séjour à 120°C durant 30 minutes, nous avons constaté les résultats présentés dans le tableau XVII.

Poids de mycélium de *Phycorynccs blakesleeanus* récoltés en ensemençant des flacons contenant des suspensions de *S.marcescens* normales, irradiées vivantes ou irradiées tuées, traitées ou non par le carbonate de soude à 10%.

suspensions de <i>S.marcescens</i> achromogène témoins	no. flacons irradi.	Vivantes irradi.	tuées
	69	42,5	36

suspensions de <i>S.marcescens</i> achromogène traitées par $\text{CO}_3 \text{Na}_2$	45	70	30
---	----	----	----

L'examen de ces résultats nous montre que l'action du carbonate de soude est moins destructrice que les rayons ultra-violets et qu'il n'y a pas cumulation de ces deux actions sur les bactéries irradiées vivantes.

Ces résultats étant acquis, tout nous portait à penser que les suspensions de *S. marcescens* achromogène apportent dans le milieu où elles sont dispersées une substance de nature vitaminique B1.

La variété chromogène de *S.marcescens*, dans les conditions où nous avons opéré jusqu'ici ne favorisant jamais la croissance de *Phycorynccs blakesleeanus*, nous avons recherché si des cultures plus âgées se comportaient de la même manière. Nous avons alors constaté qu'une culture âgée de 6 jours (à 25°C) de *S.marcescens* rouge sur gélose peptone exerçait une action favorisante, mais plus faible que la variété blanche, comme il résulte du tableau suivant:

TABLEAU XVIII -

Action des cultures de 6 jours de *S.marcescens* sur la croissance de *Phycorynccs blakesleeanus*.

	Poids de mycélium récolté en mg
suspension bactérienne de variété chromogène	32
de variété achromogène	60

Tout semble indiquer que *S.marcescens* produisant de la prodigiosine ne fournit de facteur favorisant que lorsque la production de pigment est arrivée à son terme, ou que la prodigiosine exerce une entrave sur le développement de *Phycomyces blakesleeana* en supprimant l'action du facteur favorisant.

Avant de poursuivre plus avant nos recherches, et les résultats exposés jusqu'ici ayant été obtenus en utilisant une culture effectuée sur gélose peptone, il nous a paru intéressant de voir comment agissaient, dans les mêmes conditions, les variétés chromogène et achromogène de *S.marcescens* cultivées sur milieu synthétique L1. Nous avons opéré sur des suspensions de germes provenant de cultures âgées de 6 jours à la température de 25°C et contenant 58 mg de corps bactériens humides.

Une partie de ces suspensions était soumise durant deux heures à l'action des rayons ultra-violets (produits par une lampe de Hanau), puis chauffés à 100°C pendant 30 minutes.

Une deuxième fraction était seulement portée à 100°C pendant le même temps.

Chacune de celles-ci était répartie à raison de 0,5 et 1 cm³ dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung, qui étaient ensemencés avec la même suspension de spores de *Phycomyces blakesleeana*.

Les poids de mycélium obtenus sont consignés dans le tableau:

TAB. XIX -

Action de *S.marcescens* provenant de cultures sur milieu liquide sur la croissance de *Phycomyces blakesleeana*.

		poids de mycélium sec en mg	
susp. bactérienne (cm ³)		non irradiée	irradiée puis chauffée
var. chromogène	0,5	0	0
	1	0	0
var. achromogène	0,5	15	0
	1	35	0
thiamine en ug		non irradiée	irradiée
	10	60	20
	20	65	25

Cet essai nous montre qu'une culture de 6 jours sur milieu L1 n'a pas permis de mettre en évidence une activité vitaminique de la variété chromogène de *S.marcescens*. Les suspensions de germes achromogènes ont, au contraire, une activité que les rayons ultraviolets détruisent.

Devons-nous attribuer l'action observée à une substance diffusant des corps bactériens ou à une entrave exercée par la prodigiosine elle-même sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*?

Pour examiner le bien-fondé de l'une ou l'autre de ces deux hypothèses, nous avons opéré de la façon suivante:

d) - Recherche d'un principe diffusant des corps bactériens de *S.marcescens*.

Des corps bactériens de la variété achromogène de *S.marcescens* étaient récoltés après culture sur gélose peptone durant 4 jours à 20°C. Après plusieurs lavages à l'eau distillée suivis d'une dernière centrifugation, le culot était mis en suspension dans 3 cm³ du même liquide dispersif, puis abandonné durant 4 jours à la température de 20°C.

Passé ce délai, la centrifugation permettait de séparer, d'une part, un liquide à peu près incolore, et d'autre part un culot; le premier, utilisé en nature et le culot remis en suspension dans 3 cm³ d'eau distillée, étaient, après chauffage à 100°C durant 1/2 h. répartis à raison de 0,5 et 1 cm³ par 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung.

Les spores ensemencées sur ces systèmes, donnaient, après 14 jours de culture à 25°C un mycélium. Après dessiccation de ce mycélium jusqu'à poids constant, on obtenait les poids suivants:

TABEAU XX - Action des suspensions de *S.marcescens* achromogène observée après 14j. à 20°C, sur la croissance de *Ph.blakesleeanus*.

suspension bactérienne(cm ³)			poids de mycélium sec en mg
liquide surnageant	0,5		50
culot	0,5		45
thiamine	en ug	10	82

Il semble donc, que les bactéries laissent diffuser dans l'eau distillée ou libèrent par lyse une partie au moins de la substance à activité vitaminique.

e) - Extraction et essai de la prodigiosine -

La prodigiosine exerce-t-elle une entrave sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* ?

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord procédé à l'isolement de cette substance chromogène à laquelle a été attribuée une structure pyrrolique, qui en fait une tri-pyrrolyl méthène à trois noyaux pyrroliques substitués.

Mode d'extraction de la prodigiosine -

En 1930, Wrede et Hetcher ont préconisé son extraction à partir d'une culture de *B. prodigiosus* effectuée sur gélose peptone additionnée de glucose et de sulfate de Magnésium. Après 4 à 5 jours à 25°C, la masse bactérienne récoltée était mise en contact avec de la lessive de soude pour libérer la prodigiosine retenue par les corps bactériens. Ensuite, les gornes étaient épuisés dans une ampoule à décantation avec un mélange d'éther de pétrole et d'alcool renouvelé plusieurs fois. Les solutions éthérées réunies étaient évaporées jusqu'à volume réduit. Les auteurs transformaient alors ce pigment en chlorhydrate impur, qui précipitait, en faisant passer dans la solution un courant de gaz chlorhydrique. Ce chlorhydrate était alors dissous dans l'alcool à chaud et traité par l'acide perchlorique pour aboutir à la formation de cristaux de perchlorate de prodigiosine. La soude et l'alcool, à chaud, mettaient en liberté de la prodigiosine solide, cassante, à reflets métalliques.

A ce procédé, nous avons préféré un mode d'extraction plus rapide préconisé par Lasseur et Girardet en 1926 et utilisé par Combes. On traite des cultures obtenues sur gélose ordinaire en boîtes de Roux de *B. prodigiosus* âgées de 5 jours, par de l'alcool à 95°. La prodigiosine est soluble dans l'alcool et les corps bactériens sont complètement ^edécolorés. On filtre la solution obtenue en opérant sous vide, puis on l'évapore; on la reprend par de l'alcool absolu. Après une seconde filtration et une nouvelle évaporation, le liquide est repris par de l'éther anhydre et la solution éthérée est lavée à l'eau distillée. Après décantation et évaporation, on

obtient une masse brun rougeâtre offrant des reflets métalliques.

Utilisation de la prodigiosine-

La prodigiosine étant insoluble dans l'eau, nous avons employé des solutions dans l'alcool absolu. Nous avons mis 0,05 et 0,1 cm³ de ces solutions colorées dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung, préalablement chauffés à 110°C pendant 20 minutes, ensemencés ensuite avec une suspension de spores de *Phycomyces blakesleeanus*. Certains flacons reçoivent 5 et 10 ug de thiamine; d'autres servent de témoins. Après 14 jours d'incubation à 25°C, les moyennes des poids de mycélium récoltés dans plusieurs expériences étaient les suivants:

TABLEAU XXI -

Action de la prodigiosine sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* avec ou sans thiamine.

Poids de mycélium en mg:

sol. de prodigiosine cm ³	thiamine en ug		
	0	5	10
0	0	37	77
0,05	7	55	77
0,10	17	65	57

De l'ensemble de ces résultats, il ressort que:

- la prodigiosine ne peut pas faire pousser *Phycomyces blakesleeanus* en l'absence de thiamine.

En présence de 5 ug de cette vitamine, la prodigiosine semble favoriser la croissance de ce champignon aux concentrations de 0,05 et 0,10 cm³ pour 20 cm³ de milieu.

- au contraire, en présence de 10 ug de thiamine, 0,05 cm³ de prodigiosine n'ont aucune action sur le développement mycélien alors que 0,10 cm³ de ce pigment exercent une action inhibitrice sur ce développement.

Tout nous porte à croire que c'est dans une modification métabolique qu'il faut chercher la cause de ce phénomène. Nous avons recherché si, par la méthode chromatographique, il n'était pas possible d'isoler

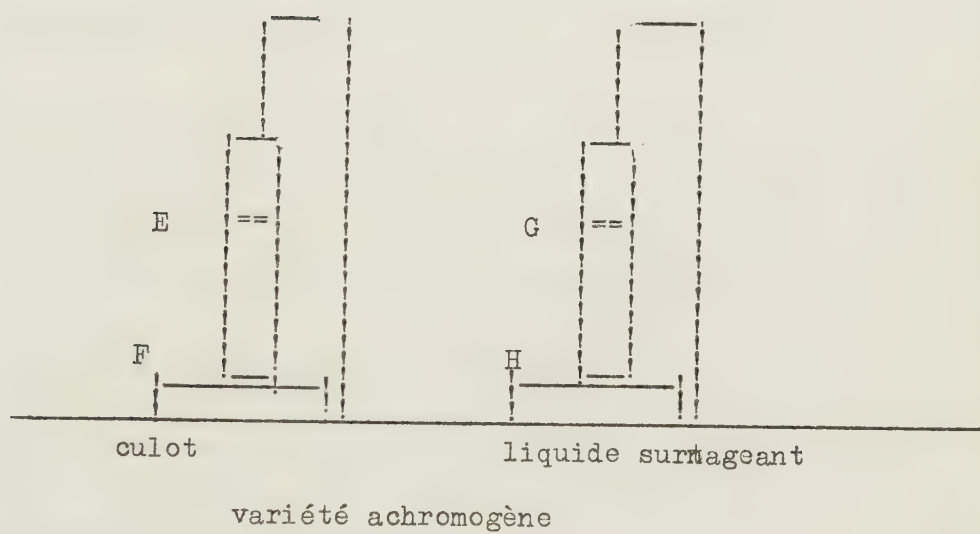
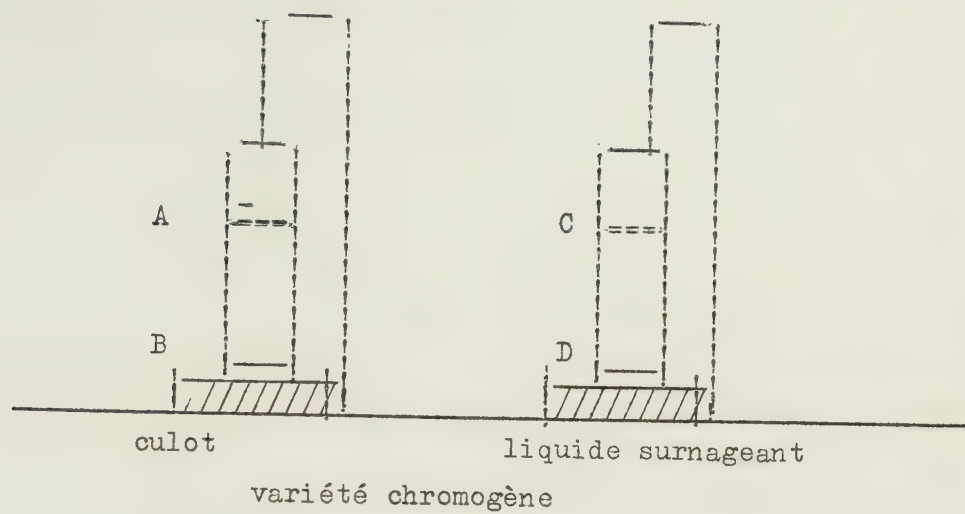
d'une suspension de *S.marcescens* en eau distillée, des substances actives ou entravantes sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

A cet effet, des suspensions dans l'eau distillée de la variété chromogène de *S.marcescens* étaient réalisées à partir de culture sur gélose à la pomme de terre: 250 mg de germes humides étaient dispersés dans 5 cm³ d'eau distillée; le tout était abandonné pendant 4 heures à 20°C.

On opérait de même avec des corps bactériens provenant de cultures achromogènes dont la concentration finale était de 2.200 mg de germes par 5 cm³ d'eau distillée.

On laissait ces suspensions à 20° pendant 4 heures. Puis on centrifugeait; les culots de centrifugation étaient remis en suspension dans le même volume d'eau distillée. On répartissait alors 10 cm³ de liquide surnageant et 10 cm³ de culot dilué dans des cristallisoirs (voir p.49) Une bandelette de papier filtre sans cendres de 40 X 200 mm était suspendue à une potence et affleurait à la surface de chacun des cristallisoirs; on abandonnait ces systèmes 2 heures sous cloche à chromatographie. Au bout de ce délai, les liquides étaient montés à une hauteur de 5cm. Dans le cas des liquides colorés, seule, la partie supérieure du chromatogramme était colorée sur un rectangle de 40 X 10 mm à 5 cm de hauteur. On découpait donc 4 rectangles de 40X10mm à 5cm de hauteur. On découpait également 4 rectangles de mêmes dimensions à la zone d'affleurement à la surface du liquide (voir tableau p.49). Ces rectangles étaient alors agités avec des billes de verre, jusqu'à obtention de suspensions homogènes. Celles-ci étaient centrifugées après un séjour à 100°C de 30 minutes.

On répartissait 0,5 cm³ de chacun de ces liquides de centrifugation dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. On ensémençait avec des spores de *Ph.blakesleeanus*. Après 14 jours d'incubation à 25°C, les poids de mycélium sec récoltés étaient les suivants:



Suspensions de *Serratia marcescens*

TABLEAU XXII' -

Action des substances solubles des différentes zones de chromatogrammes des suspensions de *S.marcescens* chromogène et achromogène.

suspension de <i>S.marcescens</i> var.chromogène	Poids de mycélium sec en mg
A	30
B	15
C	20
D	15
v.achromogène	
E	15
F	20
G	10
H	7

Les corps bactériens laissent diffuser dans le liquide surnageant une partie des substances à activité vitaminique qu'ils contiennent.

Les substances qui migrent le plus rapidement sont les substances les plus riches en activité vitaminique. Dans les variétés chromogènes, les pigments se trouvent à la partie supérieure du chromatogramme et ils n'inhibent pas la croissance du champignon-test.

Les germes chromogènes de l'espèce *S.marcescens* en culture de moins de 5 jours n'ayant révélé dans nos expériences aucune action favorisante sur le développement de *Ph. blakesleeanus*, il nous a paru intéressant de rechercher s'il en était de même avec des suspensions d'autres espèces chromogènes.

2) - Essai avec *Chromobacterium violaceum* -

Nous nous sommes tout d'abord adressée à *Chromobacterium violaceum* dont le pigment possède également une structure pyrrolique.

Dans un premier essai, nous avons opéré sur des suspensions de cet organisme. A cet effet, *Chromobacterium violaceum* était cultivé en boîtes de Roux sur gélose peptone. Après 24 heures de séjour à

25°C on recueillait les bactéries dans de l'eau distillée.

Après trois lavages successifs, on centrifugeait une dernière fois; le culot pesait 1520 mg. Les corps bactériens humides étaient alors remis en suspension dans 5 cm³ d'eau distillée.

On répartissait la suspension préalablement chauffée à 110°C pendant 20 minutes dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung qu'on ensemait avec des spores de *Ph. blakesleeanus*. Après 14 jours d'incubation à 25°C on nous avons obtenu les poids de mycélium sec consignés dans le tableau suivant:

TAB. XIII -

Action des suspensions de *Chromobacterium violaceum* sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

susp. de <i>Ch. Violaceum</i> cm ³	poids de mycélium sec en mg
0,10	70
0,25	75
0,50	110
1	120
thiamine en ug	
5	40
10	60

De cet essai, il résulte que les suspensions de *Chromobacterium violaceum* ont une action favorable manifeste sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* et qu'elles contiennent de ce fait, une substance de nature vitaminique active.

Ceci nous a conduit à rechercher si la violacéine seule était responsable de cette action. A cet effet, nous avons procédé à l'extraction de la substance chromogène en opérant de la manière suivante:

Extraction de la violacéine -

Des cultures en milieu liquide de *Chromobacterium violaceum* étaient additionnées de sulfate d'ammonium de façon à réaliser une concentration de 20% en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, puis d'un égal volume

d'éther sulfurique qui solubilisait le pigment. On décantait l'éther; la solution étherée était évaporée sous vide à basse température, pour ramener, la solution au 1/4 du volume initial.

On abandonnait le tout à 40°C jusqu'à obtention d'une laque. La purification du pigment a comporté les phases suivantes:

1- lavage à l'éther de pétrole, au chloroforme, puis à l'eau distillée,

2- entraînement à l'éther de pétrole dans l'appareil de Kuna-gawa-Suto,

3- dissolution du pigment dans aussi peu d'acétone que possible.

Après évaporation lente, le pigment est repris par l'alcool à 95°.

Dans nos essais, nous avons utilisé la solution alcoolique de violacéine qui était répartie dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung et nous avons ajouté à ces flacons des quantités de thiamine de l'ordre de 5ug. Des séries témoin ne contenaient ni thiamine, ni violacéine. On ensémençait avec des spores de *Ph.blakesleeanus*, et, après 14 jours d'incubation à 25°C, nous avons obtenu les poids de mycélium sec portés dans le tableau:

TABEAU XXIV -

Action de la violacéine avec ou sans thiamine sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

pigment(cm ³)	thiamine (ug)	poids de mycélium sec (mg)
0,1	1	32,5
0,2	1	37,5
0,5	1	30
0,1	5	57
0,2	5	75
0,5	5	75
0,1	0	0
0	1	37,5
0	5	55
0	10	65
0	20	75

De l'examen de ce tableau, il résulte que, si la violacéine n'exerce aucune action renforçatrice de la vitamine B1 utilisée à la concentration de 1 ug par 20 cm³, il n'en est plus de même pour des quantités de vitamine B1 égales à 5 ug où on note un renforcement incontestable de l'action vitaminique.

3) - Essais effectués avec le pigment de *Pseudomonas cattleyae* color

En collaboration avec J.G.Marchal (91), nous avons montré que le pigment produit par *P.cattleyae* color, qui a également une structure pyrrolique, pouvait avoir une influence sur le développement de *Ph.blakeslee* canus.

A cet effet, *P.cattleyae* color était ensemencé sur milieu L1 normal. Après quelques jours, on notait l'apparition d'un pigment caractéristique, prenant naissance à la base des tubes, au contact du précipité de phosphate complexe, et s'étendant ensuite sur toute leur hauteur.

Extraction du pigment-

Une culture de *Pseudomonas cattleyae* color sur milieu L1 normal était laissée à 25°C pendant un mois.

On l'additionnait alors de 1/10 de son volume de sous acétate de Plomb liquide. Après agitation vigoureuse, le mélange était centrifugé; il se déposait alors un précipité abondant surmonté d'un liquide limpide coloré en violet-cobalt. Ce liquide contenait un excès de Plomb que l'on précipitait avec de l'acide sulfurique N/10 ajouté jusqu'à ce que le liquide de centrifugation reste limpide à l'addition de ce réactif.

La solution colorée était alors traitée avec un excès d'acide phospho-tungstique qui précipitait le pigment. Après centrifugation, le liquide incolore était rejeté, tandis que le culot, coloré en violet-cobalt intense, était lavé plusieurs fois à l'eau distillée puis à l'acétone. Après évaporation de tout l'acétone qu'il contenait, le précipité était mis en suspension dans une solution saturée de baryte qui mettait en liberté le pigment. On centrifugeait et le liquide surnageant était recueilli; le Baryum en excès dans la solution était éliminé par addition d'acide sulfurique jusqu'à ce que la solution ne précipite plus; la solution de pigment séparée par centrifugation était neutralisée par de l'ammoniaque. On évaporait sous vide à basse température et on obtenait un enduit épais et visqueux, soluble en totalité dans l'eau bidistillée.

La solution aqueuse de pigment obtenue a une coloration comparable à celle d'une culture de 15 jours de *P.cattleyaecolor* en milieu L1.

La solution de pigment stérilisée sur bougie L3 était répartie à raison de 0,25 0,5 et 1 cm³ dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. On ajoutait 2,5 5 et 10 ug de thiamine. Tous les flacons étaient ensemencés et placés à l'étuve à 25°C. Après 14 jours de culture, on recueillait les filaments mycéliens sur des filtres tarés, on les desséchait à 100°C et on obtenait les poids indiqués dans le tableau:

TABLEAU XXV -

Action du pigment de *Pseudomonas cattleyaecolor* sur la croissance de *Ph.blakesleeae* en présence ou en l'absence de thiamine.

pigment(cm ³)	thiamine (ug)	poids de mycélium sec (mg)
0,25	0	85
0,5	0	90
1	0	90
0	2,5	40
0	5	40
0	10	55
0,25	2,5	83
0,25	5	92,2
0,25	10	93
0,5	2,5	81,6
0,5	5	83,3
0,5	10	93,3
1	2,5	82,2
1	5	110
1	10	113

L'examen de ce tableau nous montre que le pigment produit par *P.cattleyaecolor* exerce une action certaine sur le développement de *Ph. blakesleeae*.

Un apport de vitamine B1 ne semble pas favoriser la croissance du champignon quand la quantité de pigment utilisée est faible, de l'ordre de 0,25 à 0,5 cm³. Avec 1 cm³, il y a une augmentation du poids de mycélium obtenu.

L'action favorisante exercée par le pigment de *P.cattleya* color sur *Ph. blakesleeanus* pouvant être le fait d'une certaine quantité de thiamine entraînée lors de l'extraction du pigment, nous avons recherché comment se comportait la thiamine au cours du traitement que nous avons fait subir à la culture de *P.cattleya* color pour extraire la substance chromogène.

A cet effet, une solution de thiamine à 0,01 % était additionnée de 1/10 de son volume de sous-acétate de Plomb liquide, puis traitée par l'acide sulfurique N/10 en léger excès. On centrifugeait; le précipité était laissé de côté tandis que le liquide obtenu, légèrement acidifié par l'acide sulfurique était additionné d'une solution saturée d'acide phosphotungstique. Il se produisait un précipité qui était lavé à l'eau distillée puis à l'acétone et enfin dispersé dans une solution saturée de baryte. Le phosphotungstate de Baryum insolubilisé était séparé par centrifugation et l'excès de Baryum précipité par le minimum de solution d'acide sulfurique au 1/15. On ramenait à pH7 avec de la soude. La solution obtenue stérilisée sur bougie L3 et ramenée au volume initial par dilution était répartie dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung de façon à obtenir 5 et 10ug par flacon. Parallèlement, on ajoutait 5 et 10ug de thiamine non traitée à d'autres flacons et on ensemait tous les flacons avec des spores de *Ph. blakesleeanus*. Après 14 jours d'incubation à 25°C, on récoltait les filaments mycéliens sur filtres tarés et on obtenait les poids de mycélium sec consignés dans le tableau suivant:

TABLERAU XXVI -

Comparaison de l'activité d'une solution de thiamine ayant subi le même traitement que les bactéries *P.cattleya* color pour l'extraction de leur pigment sur le développement de *Ph.blakesleeanus* avec l'activité d'une solution de thiamine non traitée:

thiamine ug	poids de mycélium sec mg
non traitée : 5	75
10	80
traitée 5	60
10	65

De l'examen de ce tableau , il ressort que :

- le traitement subi ne fait pas disparaître la thiamine active de la solution. On constate seulement une faible diminution de son activité.

L'acide phosphotungstique précipite en effet la thiamine sous forme de sel insoluble dans l'eau; la baryte libère le pigment, et libère également la plus grande partie de la thiamine.

Tout semblerait donc indiquer que la solution de pigment employée dans les expériences précédentes avait conservé une partie de la thiamine active contenue dans le milieu de culture traité.

Pour apporter une nouvelle confirmation de ces faits, nous avons traité la solution de pigment par les rayons ultra-violets (produits par une lampe de Hanau privée de son écran de Wood), durant deux heures; la solution était placée à raison de 2 cm³ dans des boîtes de quartz exposées à 12 cm de la lampe.

Ces solutions étaient réparties ensuite à doses croissantes dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung, qu'on ensémençait et abandonnait ⁿ 14 jours à 25°C.

Les poids de mycélium sec obtenus ont été consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU XXVII -

Action de l'irradiation sur l'activité du pigment de *Pseudomonas cattleyae* color sur la croissance de *Phycomyces blakesleeana*:

solution de pigment	cm ³	poids de mycélium sec	en mg
non irradiée	0,25	12,5	
	0,5	60	
	1	55	
irradiée	0,25	10	
	0,5	32,5	
	1	35	

Ce tableau nous montre que le rayonnement ultraviolet détruit dans la solution de pigment une substance à activité vitaminique B1.

Si la solution de pigment contient de la vitamine B1 que la méthode d'extraction n'a pas éliminée, l'augmentation dans des proportions importantes du développement du champignon-test de la vitamine B1 ne s'en trouve pas pour autant expliquée quand il rencontre dans le milieu, l'association vitamine B1 + pigment.

Il nous est apparu que les spores de *Phycomyces blakesleeanus* placées dans ces conditions de culture donnaient un mycélium se développant davantage en surface qu'en profondeur avant de produire des filaments sporangifères? Ces faits impliquant le rôle possible d'une modification de la tension superficielle, nous avons étudié le rôle de celle-ci sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* ensemencé sur milieu de Schopfer et Jung additionné de substances abaissant la tension superficielle comme le glycocholate et le taurocholate de soude.

Nous avons tout d'abord mesuré la tension superficielle du milieu de Schopfer et Jung avec le tensionmètre de Leconte du Nouy. Nous avons constaté que celle-ci était de 74,5 dynes / cm et que l'addition de la solution de pigment, même en quantité importante, ne la modifiait pas.

Un certain nombre d'erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de culture étaient additionnés de 10 ug de thiamine; on ajoutait à certains 0,2 cm³ de solution de taurocholate de sodium à 1% et, à d'autres, 0,2 cm³ de solution de glycocholate à 1 %. Des témoins contenaient seulement 10 ug de thiamine.

La tension superficielle était de 74,5 dynes / cm et 40 dynes / cm. Les cultures étaient examinées quotidiennement, et, après 14 jours de séjour à 25° on recueillait sur filtre taré le mycélium, qui était ensuite desséché à l'étuve à 100°C jusqu'à poids constant.

Les résultats obtenus étaient consignés dans le tableau :

TABEAU XXVIII -

Action des abaissateurs de tension superficielle sur le
croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

thiamine ug	taurocho- late Na 1% cm ³	glycocho- late Na 1% cm ³	poids de mycélium sec mg
10	0	0	60
10	0,2	0	36,6
10	0	0,2	55

L'examen de ce tableau montre que :

- le développement du champignon est beaucoup moins bon lorsque la tension superficielle diminue. Ce n'est donc pas dans un abaissement de la tension superficielle qu'il faut chercher un facteur favorisant l'action vitaminique.

Tout semble donc indiquer qu'il est nécessaire de rechercher dans la solution de pigment une substance synergique de la vitaminine B1. C'est la raison pour laquelle nous avons eu recours à l'analyse capillaire pour poursuivre cette étude.

A cet effet, un petit cristalliseur contenait 10 cm³ de solution aqueuse de pigment dans laquelle on faisait tremper une bandelette de papier filtre sans cendres de 40 mm de large sur 200 mm de long qui était suspendue à une potence.

Le tout était placé en atmosphère limitée, sous une cloche à chromatographie.

Après 6 heures d'ascension, on constatait que la substance chromogène se concentrait à la partie supérieure de la bande de papier sur une longueur de 20 mm. La limite supérieure de cette zone se trouvait à 160 mm de la base du papier.

Après séchage à la température de 37°C , la bandelette de papier était découpée en une série de rectangles à des hauteurs différentes.

Nous avons obtenu les systèmes suivants:

- 1) - partie supérieure constituée par un rectangle de 20 x 40 mm
- 2) - partie médiane formée par un rectangle de 30 x 40 mm.
- 3) - partie limitée à la base par le liquide contenu dans le cristalliseur : rectangle de 15 x 40 mm.

Chacun de ces rectangles était placé dans un flacon avec 10 cm³ de milieu de Schopfer et Jung et une vingtaine de billes de verre.

Les flacons étaient agités à la main jusqu'à dissociation complète des fragments de papier-filtre. Les suspensions obtenues, centrifugées , puis stérilisées par filtration sur bougie L3 étaient réparties à raison de 1 cm³ dans 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung.

Les différents systèmes étaient ensemencés avec le même volume de suspension de spores de *Phycomyces blakesleeanus*.

Après 14 jours d'incubation à 25°C , on obtenait les poids de mycélium sec indiqués dans le tableau suivant:

TABLEAU XXIX -

Action des différentes fractions du pigment de *Pseudomonas cattleyae* séparées par chromatographie sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

	poids de mycélium sec (mg)
zone supérieure	33
zone médiane	14
zone inférieure	16
solution de pigment (1 cm ³)	84

L'examen de ce tableau nous montre que les différentes fractions séparées par chromatographie sont actives sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Les constituants colorés sont ceux qui montent le plus rapidement et sont les plus actifs.

Ces expériences ont été reprises au laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy par J.G.Marchal en 1959 (91).

Partant du fait que le pigment de *Pseudomonas cattleya* color renforçait l'activité de la vitamine B₁, cet auteur a essayé de déterminer s'il s'agissait de l'activité de la thiamine du milieu nutritif des bactéries entraînée lors de l'extraction du pigment, ou si le pigment avait une action propre de facteur de croissance additif, à action temporaire au cours des premiers jours de culture de *Phycomyces blakesleeanus*, action temporaire comparable à celle de l'hypoxanthine mise en évidence par Robbins et Kavanagh en 1942, puis par Hurni en 1951 (92) .

Cet auteur a procédé à une purification plus poussée du pigment de *Pseudomonas cattleya* color en cultivant ces bactéries en milieu L1 sans fer, dans un système de tubes tournants (méthode de M. Pouteau - Thouvenot 93) . Ce milieu était alors additionné de fer , et , après saturation au sulfate de sodium, le pigment était entraîné par l'éthanol à 95° et traité par l'éther de pétrole afin d'éliminer les sels minéraux.

Le pigment était alors purifié, soit par chromatographie sur colonne de cellulose, soit par électrophorèse.

La pureté du pigment était appréciée en dosant le fer qui y était contenu par polarographie.

Les solutions de pigment stérilisées sur bougie L3 étaient alors réparties dans des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung et ensemencées avec une suspension de spores de *Phycomyces blakesleeanus* avec et sans thiamine, afin de mettre en évidence l'action vitaminique du pigment ou l'action renforçatrice du pigment sur la thiamine ajoutée au milieu.

Les conclusions furent que la solution de pigment pur :

- avait une activité vitaminique certaine, mais non proportionnelle à la quantité de pigment.
- renforçait l'action de la vitamine B1 sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Au bout du 16^e jour, J.G.Marchal remarquait une décoloration de la solution de pigment par décomplexion du fer contenu dans le pigment; le précurseur incolore de cette substance colorée avait également une action favorisante sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*. Pour le vérifier, J.G.Marchal a réalisé une nouvelle série d'expériences en :

- purifiant le glucose du milieu par précipitation de la thiamine qu'il s'était révélé contenir, à l'aide d'acide phosphotungstique;
- complexant le fer du pigment par la 8-hydroxy-quinoléine, pour libérer le précurseur incolore du pigment;
- ajoutant au milieu des oligo-éléments pour pallier à son appauvrissement.

Les conclusions ont été les suivantes:

- le milieu de culture est appauvri et 10 ug de thiamine ne permettaient pas le développement du champignon.

- le fer seul, ajouté en même temps que les oligo-éléments (Mn et Zn) , ne permet pas la croissance du champignon;

- la thiamine ajoutée en même temps que les oligo-éléments a une activité faible sur le développement du champignon.

- le précurseur incolore, et le pigment, ajoutés au milieu , en même temps que les oligo-éléments, donnent un développement de *Phyconyces blakesleeanus* plus important que celui provoqué par 10 ug de thiamine.

Cela semble donc indiquer que, le pigment ou son précurseur incolore ont une activité vitaminique. Cette activité vitaminique n'est pas imputable au complexe fer; il semble donc que l'élément commun, le noyau pyrrolique, soit en cause.

Le fer du pigment libéré de son complexe au cours du développement de *Phyconyces blakesleeanus* joue un rôle non négligeable en augmentant la croissance du champignon.

Les résultats obtenus par J.G.Marchal (91) montrent que cette action n'est pas proportionnelle à la quantité de pigment rouge ou de précurseur incolore utilisé.

CHAPITRE III

EFFETS VITAMINIQUES D'ELEMENTS BACTERIENS D'ESPECES CHROMOGENES

SPORULEES A GRAM POSITIF.

Les bactéries utilisées jusqu'ici dans nos essais appartenaient à des espèces non sporulées à gram négatif; il nous a paru intéressant de voir comment se comportaient, dans les mêmes conditions, des germes sporulés à gram positif.

Nous nous sommes adressée successssivement à :

B. lactis niger Gorini

B. subtilis

B. mesentericus niger,

de la collection du Laboratoire de Microbiologie.

Nous avons opéré, avec des bactéries cultivées , soit en milieu peptoné gélosé, soit en milieu synthétique L1.

1) - Bactéries cultivées en eau peptonée gélosée -

Mode opératoire:

Après 24 heures de culture à 37°C, les corps bactériens étaient recueillis et lavés plusieurs fois à l'eau distillée. Le culot de centrifugation était remis en suspension dans le même liquide dispersif.

Un chauffage à 100°C durant 30 minutes avait pour but de tuer les corps bactériens. Ceux-ci étaient alors répartis dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung, qui, en même temps que des témoins sans bactéries, étaient ensemencés avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus*. Comme dans les es-

sais précédents, une fraction de chaque suspension était traitée par les rayons ultra-violetts durant 2 heures puis soumise à l'action de la chaleur, tandis qu'une autre fraction était chauffée et ensuite soumise à l'action des radiations ultra-violettes. Les résultats obtenus ont été consignés dans les tableaux ci-dessous:

a) B.lactis niger Gorini --

700 mg de corps bactériens étaient mis en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée. Un tiers de la suspension était soumis aux radiations ultra-violettes avant chauffage; un autre tiers était irradié après chauffage; enfin, le reste de la suspension était simplement chauffé à 100°C, 30 minutes. Des volumes de 0,5 et 1 cm³ de chacune de ces suspensions étaient répartis dans des erlenmeyer contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung. On obtenait les poids de mycélium :

TABLEAU XXX --

Action des corps bactériens tués de B.lactis niger Gorini sur le développement de P.blakesleeanus en milieu dépourvu de thiamine.

susp.bactérienne	poids de mycélium sec en mg		
	non irradiée	irradiée vivants	irrad.tués
0,5 cm ³	40	28	30
1 cm ³	42	37	39
témoin: thiamine 10 ug	non irradiée 50	irradiée 10	

Les suspensions de corps bactériens employés permettent le développement de Ph. blakesleeanus dans un milieu synthétique ne contenant pas de thiamine.; elles contiennent donc de la vitamine B1 active.

Le développement obtenu était moins abondant que celui qui était provoqué par l'addition au milieu de 10ug de thiamine; on peut en déduire que 35 et 70mg de corps bactériens de B.lactis niger Gorini ont une activité vitaminique inférieure à 10 ug de thiamine.

Alors que les radiations ultra-violettes rendent la thiamine

presque totalement inactive sur la croissance du champignon, ces radiations ont une action beaucoup moins marquée sur l'activité biologique des corps bactériens traités.

b) B. subtilis

660 mg de corps bactériens étaient mis en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée.

Les poids de mycélium de *P. blakesleeanus* obtenus après 14 j. d'incubation à 37°C, dans les mêmes conditions que dans l'expérience précédente, ont été les suivants:

TAB. XXXI -

Action des corps bactériens de *B. subtilis* sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* en milieu synthétique:

Poids de mycélium sec obtenus en ajoutant au milieu de Schopfer et Jung les quantités indiquées de suspensions bactériennes:

susp. bactérienne	non irradi.	irradi. viv.	irradi. tuée
0,5 cm ³	34	31,5	30
1 cm ³	46	40	37

thiamine	non irradiée	irradiée
10 ug	50	10

L'examen de ce tableau montre que:

- les corps bactériens de *B. subtilis* sont actifs sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*;
- l'activité vitaminique de 33 et 66 mg de corps bactériens est inférieure à l'activité biologique de 10ug de thiamine.

La vitamine B₁ contenue dans les corps bactériens est moins sensible à l'action destructrice des radiations ultra-violettes que la thiamine synthétique en solution aqueuse.

Ces résultats sont comparables à ceux de l'expérience précédente avec *B. lactis niger* Gorini.

c) B.mesentericus -

720 mg de corps bactériens sont mis en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée. Dans les mêmes conditions que celles décrites plus haut, les chiffres obtenus étaient les suivants:

TABLEAU XXXII -

Action des corps bactériens de B.mesentericus sur le développement de Ph.blakesleeanus en milieu synthétique.
Milieu de mycelium sec obtenu en ajoutant au milieu synthétique les quantités indiquées de suspensions irradiées ou non.

suspension bactérienne	non irradi.	irradi.viv.	irradi.tuée
0,5 cm ³	30,5	25	17,5
1 cm ³	34	30	25
thiamine	non irradiée	irradiée	
10 ug	50	10	

Les conclusions sont les mêmes que celles des expériences décrites ci-dessus, à savoir que:

l'activité vitaminique de 36 et 72 mg de corps bactériens de B.mesentericus est inférieure à l'activité biologique de 10 ug de thiamine.

II) - Bactéries cultivées en milieu liquide -

Le milieu liquide employé était le milieu synthétique L1; les différentes bactéries étaient ensemencées sur ce milieu et portées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

Le protocole suivi était le même que pour les expériences précédentes.

Les résultats obtenus ont été les suivants:

a) - B.lactis niger Gorini :

350mg de corps bactériens étaient mis en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée.

TABEAU XXXIII -

Action des corps bactériens de *B.lactis niger* Gorini cultivés sur milieu liquide L1 sur la croissance de *Phycomyces blakesleeana*.

Poids de mycélium sec obtenus en répartissant les quantités indiquées de suspension bactérienne irradiée ou non irradiée.

suspension bactérienne	non irradi.	irradi.viv.	irradi. tuée
0,5 cm ³	5	25	5
1 cm ³	22,5	32,5	12,5
thiamine	non irradiée	irradiée	
5 ug	42,5	27,5	
10 ug	75	42,5	

De ces chiffres, il ressort que:

- 17,5 et 35 mg de corps bactériens contiennent moins de 5 ug de thiamine active sur le développement de *Phycomyces blakesleeana*.

- les radiations ultra-violettes augmentent l'activité biologique de la thiamine contenue dans les corps bactériens lorsque ceux-ci sont irradiés vivants; l'irradiation des corps bactériens tués en diminue l'activité.

b) - *B.subtilis* et *B.mesentericus* -

350 mg de corps bactériens étaient mis en suspension dans 10 cm³ d'eau distillée.

Les poids de mycélium sec obtenus ont été consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU XXXIV -

Action des corps bactériens de *B.subtilis* et de *B.mesentericus* cultivés sur milieu liquide L1 sur le développement de *P.blakesleeana*

Poids de mycélium sec récoltés en répartissant les quantités indiquées de suspensions bactériennes irradiées ou non irradiées.

suspensions bactériennes		non irradi.	irradi.viv.	irradi. tuées
<i>B.subtilis</i>	0,5 cm ³	32	45	22
	1 cm ³	37	40	30
<i>B.mesentericus</i>	0,5 cm ³	22,5	22	12
	1 cm ³	45	30	21
thiamine		non irradiée	irradiée	
	5 ug	42,5	27,5	
	10 ug	75	42,5	

- 16,5 et 33 ng de corps bactériens ont une activité vitaminique inférieure à celle de 5 ug de thiamine.

- l'activité vitaminique de ces corps bactériens est moins sensible à l'action destructrice des radiations ultra-violettes lorsque ces bactéries sont irradiées vivantes.

On remarque donc, que l'activité biologique des corps bactériens provenant de cultures sur milieu liquide L1 est moins marquée que celle de corps bactériens cultivés sur milieu solide.

III - Action du carbonate de soude sur la thiamine de ces bactéries.

Le carbonate de soude a une action destructrice sur la vitamine B1. Il nous a paru intéressant de rechercher quelle était son action sur les corps bactériens étudiés.

Des cultures sur gélose ordinaire en boîtes de Roux étaient recueillies au bout de 24 H. d'incubation à 37°C. Les corps bactériens étaient lavés à l'eau distillée puis pesés.

Les corps bactériens lavés sont séparés en 2 parties: l'une est traitée par une solution de carbonate de soude à 10% pendant 1 h 30, l'autre est employée directement.

Une portion de chacune d'elles est alors irradiée pendant 2 heures puis chauffée à 100°C 30 minutes, alors qu'une portion de chacune de ces suspensions, chauffée d'abord, est irradiée ensuite.

Les 4 systèmes obtenus sont alors répartis suivant le processus indiqué plus haut. Les résultats obtenus ont été les suivants:

1) - B.subtilis: 760 mg de corps bactériens étaient mis en suspension dans 15 cm³ d'eau distillée. Les poids de mycélium obtenus ont été consignés dans le tableau ci-dessous:

TABLEAU XXXV -

Action des suspensions de B.subtilis traitées ou non au carbonate de soude sur le développement de Phycomyces blakesleeanus.

Poids de mycélium sec obtenus en ajoutant au milieu les quantités indiquées de suspensions bactériennes irradiées ou non.

suspension bactérienne	non irradi.	irrad.viv.	irrad. tuée
non traitée 0,5 cm ³	50	30	40
1 cm ³	65	45	42,5
traitée au CO ₃ Na ₂ à 10%			
0,5 cm ³	21,5	15	0
1 cm ³	25	15	20
thianine 10 ug	non irradiée	irradiée	
	62,5	5	

Le traitement au carbonate de soude a considérablement diminué l'activité bactérienne apportée par les cellules de B.subtilis.

2) - B.mesentericus : 750 mg de corps bactériens étaient mis en suspension dans 15 cm³ d'eau distillée.

Les poids de mycélium obtenus ont été consignés dans le tableau suivant:

TABLEAU XXXVI -

Action des corps bactériens de *B. mesentericus* traités ou non par le carbonate de soude sur le développement de *Ph. blakesleeanus*.

Poids de mycélium sec obtenu en ajoutant au milieu les volumes indiqués de suspension irradiée ou non.

suspension bactérienne	non irradié.	irradié.viv.	irradié. tuée
non traitée 0,5cm ³	37,5	41	42
1 cm ³	41	60	51
traitée au carbonate de soude à 10%			
0,5cm ³	11	10	10
1 cm ³	15	15	10
thiamine 10 ug	non irradiée 62,5	irradiée 5	

Le traitement par le carbonate de soude a beaucoup diminué l'activité biologique des corps bactériens de *B. mesentericus*.

Dans ces expériences également, les bactéries vivantes protègent mieux la thiamine de l'action destructrice des radiations ultraviolettes que les bactéries tuées par chauffage.

IV) - Autolyse bactérienne -

Dans les expériences précédentes, les suspensions bactériennes étaient réparties dans le milieu de culture immédiatement après irradiation. Nous avons voulu nous rendre compte si la thiamine était libérée dans la solution aqueuse après irradiation ou si cette vitamine restait dans les corps bactériens.

Des cultures de *B. lactis niger* Gorini sur gélose ordinaire en boîtes de Roux, âgées de 24 heures, étaient recueillies dans de l'eau distillée. Les corps bactériens lavés étaient alors posés et remis en suspension dans le même liquide dispersif (1485mg de corps bactériens dans 3cm³). On soumettait cette suspension à l'action des

radiations ultra-violettes pendant 1 heure 15. On centrifugeait immédiatement.

Le liquide surnageant, stérilisé par filtration sur bougie de porcelaine L3, était utilisé comme source de vitamine B1 pour la culture de *Phycomyces blakesleeanus*: 0,5 cm³ de ce liquide était ajouté à des flacons contenant 20 cm³ de milieu de Schopfer et Jung ensemencés avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus*.

Le culot, mis en suspension dans 30 cm³ d'eau distillée était stérilisé par chauffage à 100°C pendant 30 minutes et réparti, à raison de 0,5 et 1 cm³ dans des flacons de ce milieu également ensemencé avec des spores de *Phycomyces blakesleeanus*.

Les poids de mycélium sec obtenus au bout de 14 jours d'incubation à 25 °C ont été consignés dans le tableau suivant,

TABLEAU XXXVII -

Etude de l'activité vitaminique de la solution aqueuse et du culot de centrifugation d'une suspension concentrée de *B.lactis niger* Gorihi soumise à l'irradiation par les radiations ultra-violettes.

Poids de mycélium sec obtenus en ajoutant les volumes indiqués des liquides étudiés au milieu.

thiamine en ug	poids de mycélium ng
5	37
10	77
liquide surnageant 0,5 cm ³	40
culot 0,5 cm ³	27,5
1 cm ³	55

L'examen de ce tableau montre l'importance de la thiamine libé-

rée au cours de l'irradiation.

Elle représente une faible partie de la thiamine contenue dans les corps bactériens qui restent actifs sur le développement du champignon. Cette quantité de thiamine libérée n'est cependant pas négligeable.

V - Influence de la composition des milieux de culture synthétiques sur la production par les germes sporogènes de substances favorisant le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Dans les essais qui suivent, nous avons tenté d'élucider comment sont susceptibles de retentir sur la genèse des facteurs favorisants observés dans la culture des germes sporulés, les différents éléments constitutifs des milieux synthétiques utilisés.

a) - Influence du fer -

Deux séries d'expériences ont été réalisées, l'une, après développement sur milieu L1 non additionné de fer, l'autre, sur milieu L1 normal.

En effet, les bactéries étudiées se développent également bien sur le milieu dans lequel le fer n'avait été apporté qu'à l'état d'impureté par les réactifs utilisés.

Les poids de germes sporulés utilisés étaient de 40 mg de corps bactériens humides récoltés au bout de 24 h. d'incubation à 37°C pour 1 cm³ de suspension.

Les suspensions, chauffées à 100°C 30 minutes étaient réparties, après irradiation d'une partie de chacune d'elles à raison de 0,5 et 1 cm³ dans des flacons contenant 20cm³ de milieu de Schopfer et Jung qui étaient ensemencés avec des spores de *Ph.blakesleeanus*. Après 14 jours d'incubation à 25°C, les poids de mycélium récoltés ont été les suivants:

1°/ - TABLEAU XXXVIII -

Action des corps bactériens des germes étudiés cultivés sur milieu L1 sans fer, traités ou non par les radiations ultra-violettes sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*

Poids de mycélium sec obtenus en ajoutant au milieu les volumes indiqués de suspensions bactériennes traitées ou non par les radiations ultra-violettes

suspensions bactériennes	non irradiée	irradiée
<i>B. subtilis</i>		
0,5 cm ³	30	0
1 cm ³	45	0
<i>B. mesentericus</i>		
0,5 cm ³	0	0
1 cm ³	0	0
<i>B. lactis niger</i> Gorini		
0,5 cm ³	60	0
1 cm ³	65	0
thiamine		
10 ug	90	5
20 ug	112,5	

Dans l'expérience suivante, les corps bactériens utilisés ont été cultivés sur milieu L1 normal et, ensuite, traités ou non par les radiations ultra-violettes:

2°/ - TABLEAU XXXIX -

Action des corps bactériens cultivés sur milieu L1 normal et soumis ou non à l'irradiation ultra-violette, sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

Poids de mycélium sec obtenu en ajoutant au milieu les volumes indiqués des suspensions traitées ou non par les radiations ultra-violettes:

suspensions bactériennes	non irradiée	irradiée
B.subtilis 0,5 cm ³	32	22
1 cm ³	37	30
B.mesentericus		
0,5 cm ³	22,5	12
1 cm ³	45	21,5
B.lactis niger Gorini		
0,5 cm ³	5	5
1 cm ³	22,5	12,5

L'examen de ces tableaux nous montre que l'activité vitaminique des corps bactériens cultivés sur milieu L1 sans fer est totalement inhibée par les radiations ultra-violettes.

Alors que l'activité vitaminique des corps bactériens de B.lactis niger Gorini est accrue en l'absence de fer, les corps bactériens de B.mesentericus et de B.subtilis n'ont plus aucune activité sur le développement de Phycomyces blakesleeanae, lorsqu'ils proviennent de cultures sur milieu L1 sans fer.

B) - Influence de la source d'azote du milieu -

Pour étudier l'influence de la variation de la source d'azote sur la production de thiamine par les bactéries, nous avons supprimé l'asparagine du milieu de base, et nous l'avons remplacée par un autre acide aminé:

1) - la dl-alanine -

La quantité d'acide aminé était calculée en fonction de la quantité d'azote contenue dans sa molécule. C'est ainsi que 2,50 g

de dl-alanine pouvaient remplacer 0,90 d'asparagine.

Les concentrations des suspensions bactériennes employées étaient de 30mg de corps bactériens humides pour 1 cm³ de suspension.

Les poids de mycélium sec de *Phycomyces blakesleeanus* obtenus étaient les suivants, en opérant dans les mêmes conditions que dans les expériences précédentes:

TABLERAU XL -

Action de la dl-alanine sur la production de thiamine active sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus* par les corps bactériens étudiés.

Poids de mycélium sec récolté en ajoutant au milieu les volumes indiqués des suspensions de corps bactériens cultivés sur milieu L1 normal et sur milieu L1 où l'asparagine a été remplacée par la dl alanine.

suspensions bactériennes		provenant de bactéries cultivées sur milieu L1 normal milieu L1 modifié	
B.subtilis	0,5cm ³	32	5
	1 cm ³	37	10
B.mesentericus	0,5cm ³	22,5	15
	1 cm ³	45	20
B.lactis niger G.	0,5cm ³	5	25
	1 cm ³	22,5	25
thiamine	10 ug	poids de mycélium en mg 90	

La modification de la source d'azote du milieu L1 effectuée n'a pas une action favorable sur la production de thiamine active par B.subtilis et par B.mesentericus , mais augmente l'activité des corps bactériens de B.lactis niger Gorini sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

2- glycocolle ajouté au milieu L1 -

Nous avons utilisé un milieu contenant 1,100 g de glycocolle pour 100 cm³.

Les concentrations bactériennes des suspensions employées étaient de 3⁰ ng de corps bactériens humides pour 1cm³ de suspension. Les expériences réalisées dans les mêmes conditions que les expériences précédentes permettaient d'obtenir les poids de mycélium sec de *Ph.blakesleeae* indiqués dans le tableau ci-dessous où figurent également les résultats obtenus dans des expériences témoin réalisées avec des suspensions bactériennes de germes cultivés sur milieu L1 normal.

TABLEAU XLI -

Action de l'addition de glycocolle au milieu L1 sur la production de thiamine active sur la croissance de *Ph.blakesleeae* par les corps bactériens étudiés.

Poids de mycélium sec récolté en ajoutant au milieu les volumes indiqués des suspensions de corps bactériens cultivés sur milieu L1 normal et sur milieu L1 au glycocolle.

suspensions bactériennes		provenant de bactéries cultivées sur milieu L1 normal milieu L1 au glycocolle	
<i>B.subtilis</i>	0,5cm ³	32	20
<i>B.mesentericus</i>	0,5cm ³	22,5	55
	1 cm ³	45	50
<i>B.lactis niger</i> G.	0,5cm ³	5	3,5
	1 cm ³	22,5	7
thiamine	10 ug	poids de mycélium en ng 90	

La présence de glycocolle augmente l'activité des suspensions de *B.mesentericus* sur le développement de *Phycomyces blakes-*

locamus, mais non celle de *B. subtilis* et de *B. lactis niger* Gorini.

3 - Remplacement de l'asparagine par le pyruvate d'ammonium -

La source d'azote employée était alors le pyruvate d'ammonium (0,50 g pour 100 cm³).

Les corps bactériens étaient récoltés au bout de 24 heures d'incubation à 37°C. On opérait avec des suspensions dont la concentration en corps bactériens était de 30 mg de bactéries humides pour 1 cm³ de suspension.

TABLERAU XLII -

Action du remplacement de l'asparagine par le pyruvate d'ammonium dans le milieu de culture des bactéries étudiées sur leur production en thiamine active.

Poids de mycélium sec récolté en ajoutant les volumes indiqués des suspensions bactériennes cultivées sur milieu L1 normal et sur milieu L1 modifié au milieu.

suspensions bactériennes		provenant de bactéries cultivées sur	
		milieu L1 normal	milieu L1 modifié
<i>B. subtilis</i>	0,5cm ³	32	12
	1 cm ³	37	15
<i>B. mesentericus</i>	0,5cm ³	22,5	55
	1 cm ³	45	67
<i>B. lactis niger</i> G.	0,5cm ³	5	45
	1 cm ³	22,5	60
thiamine	10 ug	poids de mycélium en mg	
		90	

L'examen de ce tableau montre que ces nouvelles conditions de culture ont une action défavorable sur l'activité vitaminique de *B. subtilis*. Par contre, l'activité des suspensions de *B. mesentericus* et de *B. lactis niger* Gorini semble augmenter.

c) - Influence de la variation de la source de carbone-

Remplacement de la glycérine du milieu L1 par le glucose-

La quantité de glucose à ajouter au milieu était calculée en fonction du poids du carbone contenu dans chacune des molécules considérées (4,00 g pour 100 cm³).

Les suspensions de corps bactériens employées contenaient 30 ng de bactéries humides pour 1 cm³ de suspension. On opérait dans les mêmes conditions que précédemment et on obtenait les résultats suivants:

TABLEAU XLIII -

Action du remplacement de la glycérine par le glucose dans le milieu L1 sur la production de thiamine des bactéries cultivées.

Poids de mycélium sec de *Ph.blakesleeana* récoltés en ajoutant au milieu les volumes indiqués des suspensions bactériennes étudiées.

suspensions bactériennes		provenant de cultures sur milieu:	
		L1 normal	L1 modifié
<i>B.subtilis</i>	0,5 cm ³	32	0
	1 cm ³	37	10
<i>B.nesentericus</i>	0,5 cm ³	22,5	40
	1 cm ³	45	50
<i>B.lactis niger</i> G.	0,5 cm ³	5	10
	1 cm ³	22,5	10
thiamine		poids de mycélium sec en ng	
10 ug		90	

La production de thiamine active est considérablement diminuée lorsque *B.subtilis* et *B.lactis niger* Gorini proviennent du milieu L1 où la glycérine a été remplacée par du glucose.

Seul, *B.nesentericus* est encore actif d'une façon notable sur le

développement de *Phycomyces blakesleeanus* lorsqu'il est cultivé dans ces conditions.

d) - Autre modification du milieu L1: remplacement de la glycérine et de l'asparagine par le pyruvate d'ammonium et le chlorure d'ammonium employés comme seules sources d'azote et de carbone.

Nous avons introduit dans le milieu L1 sans glycérine, 0,500 g de pyruvate d'ammonium et 0,500 g de chlorure d'ammonium.

Les concentrations des suspensions bactériennes employées étaient de 30 ng de bactéries humides pour 1cm³ de suspension.

TABEAU XLIV -

Action du remplacement de l'asparagine et de la glycérine du milieu L1 par le pyruvate d'ammonium et le chlorure d'ammonium sur la production de thiamine active des corps bactériens cultivés dans ce milieu.

Poids de mycélium récoltés en ajoutant au milieu les volumes indiqués des suspensions de corps bactériens étudiés.

suspensions bactériennes		provenant de cultures sur milieu:	
		L1 normal	L1 modifié
B.subtilis	0,5cm ³	32	6
B.mesentericus	0,5cm ³	22,5	11
B.lactis niger G.	0,5cm ³	5	10
thiamine		poids de mycélium sec en ng	
10 ug		90	

Les bactéries cultivées dans les conditions indiquées continuent à produire de la thiamine active sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Nous avons vu au début de ce chapitre que les trois espèces bactériennes étudiées:

B.lactis niger Gorini

B.subtilis

B.mesentericus

étaient actives sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*.

Les corps bactériens considérés protègent la thiamine qu'ils contiennent de l'action destructrice des radiations ultra-violettes.

Le traitement des ces bactéries par un oxydant alcalin, le carbonate de soude, diminue l'activité biologique de *B.subtilis* et de *B.mesentericus* alors que les corps bactériens de *B.lactis niger* Gorini voient leur activité vitaminique augmentée; ce qui peut s'expliquer par l'action du carbonate de soude sur la thiamine: décomposition en pyrimidine et en thiazol, qui, dans ce cas, conservent intacte leur propriété de se combiner à nouveau sous l'influence de la thianinase produite par *Phycomyces blakesleeanus*.

Des autres expériences exposées dans ce chapitre, nous avons tiré les conclusions suivantes:

- il apparaît que le milieu L1 normal est le plus favorable à la production de thiamine par les bactéries, alors que *B.mesentericus* reste très actif sur le développement de ce champignon lors d'autres modifications (remplacement de la glycérine par le glucose, remplacement de l'asparagine par le pyruvate d'ammonium, addition de glycocolle au milieu); on peut observer que le remplacement simultané de l'asparagine et de la glycérine par le pyruvate et le chlorure d'ammonium diminue de façon appréciable l'activité vitaminique de cette espèce bactérienne.

Nous avons pu également observer (tableau XXXVIII p.73) que *B.mesentericus* provenant de cultures sur milieu L1 sans fer était totalement inactif sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*. Ce milieu ne permet donc pas à cette bactérie de se développer normalement et de produire de la thiamine active biologiquement.

- Par contre, les deux autres espèces bactériennes étudiées: *B.subtilis* et *B.lactis niger* Gorini, cultivées sur milieu L1 sans fer, sont actives sur la croissance du champignon-test. Il est de même à noter que l'activité vitaminique de *B.lactis niger* Gorini est plus grande lorsque ces bactéries ont été cultivées sur milieu L1 dépourvu de fer ^{que} lorsqu'elles proviennent de cultures sur milieu L1 normal.

Le rôle du fer dans le milieu L1 n'est donc pas identique dans tous les cas étudiés.

Des milieux étudiés, celui qui est le plus favorable à la production de bactéries actives sur le développement de *Phycomyces blakesleeanus*, est le milieu L1 non modifié. Cependant, dans certains cas, le fer n'a pas une action favorable (*B.lactis niger* Gorini).

RESUME ET CONCLUSIONS

Le fer ajouté au milieu de Schopfer et Jung sous forme de SO_4Fe n'a pas une action notable sur le développement mycélien. Lorsque, irradié, il devient ferrique et a une action inhibitrice sur la croissance du champignon.

Des différents acides aminés étudiés, le glycolle, l'uracile, ajoutés au milieu, ne peuvent remplacer la thiamine et n'ont pas une action notable sur le développement mycélien en présence de cette vitamine. Par contre, la tyrosine et la dl-alanine, ajoutées au milieu, augmentent l'utilisation de la vitamine B₁ par *Phycomyces blakesleeana*. Il en est de même de l'acide folique.

L'action de la streptomycine, d'abord favorable au développement du champignon, devient inhibitrice si la concentration de cet antibiotique augmente.

Les colorants étudiés ont une action variable sur le développement observé:

- d'une part, la xanthine peut remplacer la thiamine et provoquer l'apparition de sporangiophores;
- le jaune de thiazol est également actif seul;
- le jaune de chloramine C et le thiocarmin R ont une action inhibitrice sur le développement mycélien en présence de thiamine;
- le jaune de thiazol donne les mêmes résultats en présence de cette vitamine;
- la primuline, elle, favorise l'utilisation de la thiamine par *Phycomyces blakesleeana*.

D'autres colorants organiques, tels le violet de gentiane, le vert malachite, l'érythrosine et l'éosine, ne permettent pas la croissance du champignon; les trois derniers entravent même le développement de *Phycomyces blakesleeanus* en présence de thiamine.

Au contraire, le violet de gentiane favorise l'utilisation de cette vitamine. Ce colorant présent pendant l'irradiation, protège la thiamine de l'action inactivante des radiations ultraviolettes.

Les corps bactériens de *S.marcescens* chromogène n'ont aucune activité vitaminique sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*, alors que les espèces achromogènes permettent le développement mycélien dans un milieu sans thiamine. Cette activité semble bien d'origine vitaminique puisque les radiations ultra-violettes l'inhibent partiellement, de même que la carbonate de soude, agents destructeurs de la thiamine. Les autres bactéries chromogènes étudiées sont actives sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus*.

Enfin, les bactéries sporulées Gram + étudiées étaient également actives. Cette activité diminuant sous l'influence d'un oxydant alcalin, semblait d'origine vitaminique.

Parmi les différents milieux de culture synthétiques utilisés, le plus favorable à la production de germes actifs sur la croissance de *Phycomyces blakesleeanus* était le milieu L1 non modifié.

En résumé, toutes les bactéries ne se comportent pas de la même façon et les germes Gram + et Gram -, chromogènes et achromogènes, ont des capacités d'action très différentes en fonction des diverses

conditions de culture et des divers traitements subis par
les corps bactériens.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

Armour Research Foundation Anal.Chem. 1948, <u>20</u> , 683-4	1
L.ATKIN A.S.SCHULTZ et C.N. FREY: J.Biol.Chem. 1939, <u>129</u> ,471	90
I.BANGA S.OCHOA R.A.PETERS Biochem.J. 1939, <u>33</u> ,1980	46
F.M.BACHMAN J.Biol.Chem. 1919, <u>39</u> ,235	74
G.BARGER F.BERGELL A.TODD Nature 1935, <u>136</u> ,259	67
E.S.BARRON C.M.LYMAN M.A.LIPTON et J.M.GOLDINGER J.Biol.Chem. 1941, <u>140</u> ,XI	60
E.S.BARRON C.M.LYMAN H.Biol.Chem. 1941, <u>141</u> ,951,957 et 975	55
T.W.BIRCH L.J.HARRIS Biochem.J. 1934, <u>28</u> ,602	25
" " " "	72
H.H.BUNZELL Ind.Eng.Chem.Anal. 1942, <u>14</u> ,279	87
E.R.BUCHMAN E.HELGRAD et J.BONNER Proc.nat.Acad.Sci. 1940, <u>26</u> ,61	6
P.R.BURKHOLDER Amer.J.Botany 1943, <u>30</u> ,206	17
P.R.BURKHOLDER et D.MOYER Bull.Torrey Bot.Club 1943, <u>70</u> ,372	18
M.CHIBA TOHOKU J.Exp.Med. 1932, <u>19</u> ,486	30
L.EMERIQUE-BLUM et A.LWOFF Bull.Soc.Chim.Biol. 1940, <u>22</u> ,179	82
W.B.EMERY N.MC LEOD F.A.ROBINSON Biochem.J. 1946, <u>40</u> ,426	19
von EULER et R.WESTEN Naturwiss. 1937, <u>25</u> ,416	39
F.T.H.FARRER Austral.Chem.Inst.J.a.Prod.1941, <u>8</u> ,113	2
E.E.FITZGERALD E.B.HUGH Analyst 1949, <u>74</u> ,340	84
N.FRIES Symbolae Botan.Upsalienes 1938, <u>3</u> ,N°1 Rev.app.Mycol. <u>18</u> 335	15
H.FUNCK F.JUST Biochem.Z. 1941, <u>308</u> ,15 et <u>309</u> ,1,212 et 219 et 1942, <u>313</u> ,39	22
C.FUNK Z.Physiol.Chem. 1914, <u>89</u> ,378	23
A.GEIGER A.ROSENBERG Klin.Woch. 1933, <u>12</u> ,1258	29
A.GOTH Z.Vitaminforsch. 1944, <u>14</u> ,231	27bis
E.HAAG C.DALPHIN Arch.Sci.phys.nat. 1940, <u>22</u> ,suppl.76	21

K.HAYNES Z.physiol.Chem. 1938, <u>258</u> ,319	86
G.M.HILLS Biochem.J. 1938, <u>32</u> ,83	36
H.HURNI Z.Vitaminforsch.1945, <u>16</u> ,69	92
B.C.P.JANSEN Réc.trav.Chim. 1936, <u>55</u> ,1046	68
" et DONATH Proc.Akad.Wetensch.Amsterdam 1926, <u>29</u> ,1390	70
P.KARRER et VISCONTINI Helv.Chemica Acta 1946, <u>29</u> ,711	57
H.W.KINNERSLEY et R.A.PETERS Biochem.J. 1934, <u>28</u> ,867	61
" " " 1938, <u>32</u> ,1516	62
" " " 1928, <u>22</u> ,4319	71
" " " 1933, <u>27</u> ,225-232	71
" " " 1929, <u>23</u> ,1126 et 1930, <u>24</u> ,711	24
F.KOGL et N.FRIES Z.Physiol.Chem. 1937, <u>249</u> ,93	14
H.A.KREBS Nature 1936, <u>138</u> ,288	35
" et W.A.JONSON Biochem.J. 1937, <u>31</u> ,645	35
" Nature 1941, <u>147</u> ,560	47
" L.V.EGGLETON A.KLEINZELLER D.H.SMITH Biochem.J. 1940, <u>34</u> ,1234	48
M.G.KRITZMAN Biochimia 1943,885	50
F.LIPMAN Nature 1937, <u>140</u> ,25	45
" " " " " et Enzymologia 1937, <u>4</u> ,65	51
" Skand.Arch.Physiol.1937, <u>76</u> ,255	52
M.A.LIPTON C.A.ELVEHJEM Nature 1940, <u>145</u> ,226	43
K.LOHMAN P.SCHUSTER Naturwiss. 1937, <u>25</u> ,26 et Biochem.J. 1937, <u>31</u> ,645	34
A.LWOFF Amer.Ferm.1936, <u>2</u> ,419	5
M.LWOFF C.R.Soc.Biol.1937, <u>126</u> ,1771	8
A. et M.LWOFF C.R.Soc.Biol. 1937, <u>126</u> ,644	7
J.G.MARCHAL M.BOUSSARD Bull.Assoc.dipl.Microb.Fac.Pharm.Nancy 1957, <u>69</u> ,24	
" F.LOTZ Trav.Lab.Microb.Fac.Ph.Nancy Fasc.XVII 1953,31	91

A.P.MEIKLEJOHN Biochem.J. 1937, <u>31</u> ,1441	76
D.MELNICK H.FIELD J.Biol.Chem.1939, <u>127</u> ,505	64
" " " 1939, <u>130</u> ,97	65
T.MORELL Deut.med.Woch. 1938, <u>64</u> ,1722	78
C.H.NIVEN K.L.SMILEY J.Biol.Chem.1943, <u>150</u> ,1	83
I.NITZESCU C.ANGELESU Z.Vitaminforsch.1942, <u>12</u> ,82	26
R.A.PETERS NATURE 1935, <u>135</u> ,107	66
" " 1946, <u>158</u> ,707	59
" Lancet 1936, <u>1</u> ,1161	32
M.POUTEAU-THOUVENOT Fasc.Trav.Lab.Microb.Fac.Pharm.Nancy 1949,125	93
H.J.PREBLUDA E.V.MC COLLUM Science 1936, <u>84</u> ,488	63
K.RAUCH et PECKER Biochem.Z.1950, <u>21</u> ,321	79
W.J.ROBBINS F.KAVANAGH Bot.Rev.1942, <u>8</u> ,411	87bis
" " Proc.Nat.Acad.Sci. 1937, <u>23</u> ,499	16
" R.MO Bull.Torrey Bot.Club 1943, <u>70</u> ,372	10
W.D.ROBINSON D.MELNICK H.FIELD J.clin.Invest.1940, <u>19</u> ,483	28
H.P.SARETT V.H.CHELDELIN J.Biol.Chem.1944, <u>155</u> ,153	80
W.H.SCHOPFER Plants and Vitamins. Waltham Mass.USA 1949	9
" Ber.Deut.Botan.Ges.1937, <u>55</u> ,572	11
" S.BLUMER C.R.Soc.Biol.1938, <u>206</u> ,1146	12
" Z.Vitaminforsch.1939, <u>4</u> ,67	75
" et JUNG C.R. V Cong.intern.Techn.Chin.Ind.Agr. Scheveningen 1937, <u>1</u> ,22	75
" " Chem.Zentralblatt 1938, <u>2</u> ,1987	75
A.S.SCHULTZ L.ATKIN C.N.FREY J.Amer.Chem.Soc.1937, <u>59</u> ,948 et 2457 et 1938, <u>60</u> ,1514	85
" " Arch.Biochemistry 1947, <u>14</u> ,369	20
W.H.SEBRELL Jr R.S.HARRIS The Vitamins Vol.ed. BY Acad.Press NY 1954, 403	58
W.C.SHERMAN C.A.ELVEHJEM Biochem.J.1936, <u>30</u> ,785	33

M.E.SHILLS H.G.DAY E.V.MC COLLUM J.Biol.Chen.1941, <u>139</u> ,145	49
M.SILVERMAN C.H.WERKMAN Proc.Soc.Exp.Biol.Med.1939, <u>40</u> ,369	40
A.H.SMITH C.E.MEYER J.Biol.Chen.1941, <u>139</u> ,277	49
K.G.STERN J.L.MELNICK J.Biol.Chen.1939, <u>131</u> ,597	53
" " " 1940, <u>135</u> ,365	54
H.TAUBER Science 1937, <u>86</u> ,180	38
R.THREN Vitamine u.Hormone 1941, <u>1</u> ,100	80
A.R.TODD F.BERGELL J.Chem.Soc.Biol.1948, <u>15</u> ,871	44
L.WELLUZ G.AMARD J.BARTOS Bull.Soc.Chim.Bioch.1948, <u>15</u> ,871	44
" " " J.Biol.Chen.1949, <u>180</u> ,1137	44
J.VOGT-MULLER Biochem.Z.1931, <u>233</u> ,248	31
H.WEIL-MALHERBE Biochen.J. 1940, <u>34</u> ,280	41
" " 1939, <u>33</u> ,1997	42
P.M.WEST P.M.WILSON Science 1938, <u>88</u> ,334	81
H.G.K.WESTENBRINK J.J.POLLAK Réc.Trav.Chim.Pays-Bas 1937, <u>56</u> ,369	37
" E.P.S.PARVE A.C.van den LINDEN W.A. van den BROCK Z.Vitaminforsch.1943, <u>63</u> ,218	89
" B.C.P.JANSEN Acta brev.Neerland.Physiol.1938, <u>8</u> ,119	69
A.H.SMITH R.J.WILLIAMS J.Biol.Chen.1920, <u>42</u> ,259	73
" J.R.MAC MAHAN R.E. AEKIN Univ.Texas Publ.1941, <u>4137</u> ,31	88
" J.K.CLINÉ J.Amer.Chem.Soc.1936, <u>58</u> ,1504	3
WOOD TATUM PETERSON J.Bact.1937, <u>33</u> ,227	13
O.ZIMA K.RITSERT T.MOLL Z.Physiol.Chem.1941, <u>276</u> ,210	56

UNIVERSITE DE NANCY -

FACULTE DE PHARMACIE -

ADMINISTRATION

Doyen : Professeur F. KAYSER

Assesseur: Professeur A. MEUNIER

Secrétaire principal : B. SEUROT

Personnel enseignant : Professeurs :

M.	MEUNIER A.	Pharmacie galénique
Mlle	FRANCOIS M.Th.	Matière médicale
MM.	KAYSER F.	Chimie
	FRANQUET R.	Botanique
	MARCHAL J.G.	Microbiologie
	STEIMETZ E.	Sciences naturelles
	BLOCH J.M.	Toxicologie
	SOLEIL J.	Pharmacie chimique
	BERNANOSE A.	Physique
Mlle	BESSON S.	Pharmacodynamie

Maîtres de Conférences Agrégés :

MM.	BENE R.	Microbiologie
	MIRJOLET M. (délégué)	Sciences physico-chimiques
	PIERFITTE M. (délégué)	Chimie biologique

Chargés de cours complémentaires:

M.	MEUNIER A.	Hydrologie
Mlle	FRANCOIS M.Th.	Hygiène
MM.	KAYSER F.	Biochimie technique
	FRANQUET R.	Cryptogamie
	MARCHAL J.G.	Parasitologie
	STEIMETZ E.	Mycologie Minéralogie
	BLOCH J.M.	Chimie minérale
	SOLEIL J.	Chimie organique
	BERNANOSE A.	Optique et Acoustique
	GRANGER (Professeur à la Faculté de Droit)	Déontologie
Mlle	BESSON S.	Techniques spéciales et méthodes modernes d'analyses
MM.	BENE R.	Bactériologie
	ANZIANI P.	Caractères analytiques des sels
Mme	LASSEUR A.	Techniques spéciales d'analyses bactériologiques
MM.	MIRJOLET M.	Chimie analytique
	PIERFITTE M.	C.E.S. Chimie biologique
Mlle	HEINRICH S.	Matière médicale

Chefs de travaux :

M.	ANZIANI P.	Chimie
Mme	LASSEUR A.	Microbiologie Parasitologie

MM. VILLOUTREIX J.	(stagiaire)	Micrographie
MARTIN J.A.	(délégué)	Chimie
Mlle GIRARD Th.	(déléguée)	Microbiologie technique
Mlle LAURENT F.	(déléguée)	Physique
Mlle DAUCHY S.	(déléguée)	Chimie biologique
Mlle HEINRICH S.	(déléguée)	Sciences pharmaceutiques

Doyen honoraire : M. RICHARD Recteur de l'Académie de
Montpellier

Professeurs honoraires: M. CORDEBARD - M. DOURIS

Vu
NANCY le 27/2/61
Le Président de thèse
J.G.MARCHAL

Vu et approuvé
NANCY le 27/2/61
Le Doyen de la Faculté
F. KAYSER

Vu et permis d'imprimer
NANCY le 28/2/61
Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université
P. IMBS

